



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**PROGRAMA PROFISSIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

**MARIA OLÍVIA PEREIRA DA SILVA MARTINS**

**LIPPIA ORIGANOIDES CARREADA EM MICROEMULSÃO COM ATIVIDADE  
ANTIBIOFILME EM MATERIAL ODONTOLÓGICO PARA PRÓTESE DENTÁRIA**

**FORTALEZA – CEARÁ**  
**2023**

MARIA OLÍVIA PEREIRA DA SILVA MARTIINS

LIPPIA ORIGANOIDES CARREADA EM MICROEMULSÃO COM  
ATIVIDADE ANTIBIOFILME EM MATERIAL ODONTOLÓGICO PARA  
PRÓTESE DENTÁRIA

Dissertação apresentada ao  
Curso de Mestrado Acadêmico  
em Saúde Coletiva do Centro  
de Ciências da Saúde da  
Universidade Estadual do  
Ceará, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestra em  
Saúde Coletiva. Área de  
Concentração: Saúde Coletiva.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria  
Zenaide de Lima Moreno  
Frnandes.

Coorientador: Prof. Dr.  
André Luís Meneses Carvalho.

FORTALEZA – CEARÁ

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Estadual do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Martins, Maria Olívia Pereira da Silva.  
Lippia origanoides Carreada Em Microemulsão  
Com Atividade Antibiofilme Em Material  
Odontológico Para Prótese Dentária [recurso  
eletrônico] / Maria Olívia Pereira da Silva  
Martins. - 2023.  
80f.: il.

Dissertação (MESTRADO PROFISSIONAL) -  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de  
Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em  
Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal,  
Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof.e Dra. Maria Zenaide de Lima  
Chagas Moreno Fernandes.

1. Antifúngicos. 2. Idosos. 3. Plantas  
Medicinais. 4. Sistemas Microemulsionados. I.  
Título.

MARIA OLÍVIA PEREIRA DA SILVA MARTINS

*Lippia origanoides* CARREADA EM MICROEMULSÃO COM ATIVIDADE  
ANTIBIOFILME EM MATERIAL ODONTOLÓGICO PARA PRÓTESE DENTÁRIA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Coletiva do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva. Área de concentração: Saúde Coletiva.

Aprovada em 20/01/2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 MARIA ZENAIDE DE LIMA CHAGAS MORENO  
Data: 20/01/2023 17:31:18-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Dra. Maria Zenaide de Lima Moreno Fernandes (Orientadora)  
Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Piauí - UFPI

Documento assinado digitalmente  
 MARIA JOSE DOS SANTOS SOARES  
Data: 23/01/2023 17:11:44-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares  
Departamento de Microbiologia - Universidade Federal do Piauí – UFPI

Documento assinado digitalmente  
 GLAUBER CAMPOS VALE  
Data: 24/01/2023 16:19:38-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Glauber Campos Vale  
Departamento de Odontologia - Universidade Federal do Piauí - UFPI

Ao meu papai, Abílio Pereira da Silva, *in memoriam*, exemplo de simplicidade, dedicação, amor à família e fonte de minha inspiração para esta pesquisa. A meus irmãos, em especial à Maria da Paz que, nos momentos mais complicados e difíceis, fez jus à palavra “irmã” e me proporcionou espaço mental de tranquilidade e serenidade, no qual fui capaz de retomar o foco nesta pesquisa. A eles, todo meu amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, que possibilitou a realização deste sonho, a quem dou Graças e Venero todos os dias de minha vida.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Zenaide de Lima Chagas Moreno Fernandes, pela disponibilidade, dedicação e, acima de tudo, pela forma amigável e sincera de contribuir significativamente para meu crescimento e amadurecimento ao longo desta jornada.

Ao meu coorientador Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho, pela forma inteligente e cuidadosa como conduziu o desenrolar das atividades desta pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Antônia Maria das Graças Citó, pela receptividade e atenção que dedicou a mim, contribuindo fortemente para o desenlace da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Glauber Campos Vale, pela incalculável contribuição para os testes das microemulsões.

À Beatriz Santiago de Matos Monteiro Lira, Mestra em Ciências Farmacêuticas, pela atenção, cuidado e precisão em suas orientações.

Ao Matheus Oliveira do Nascimento, Doutorando em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e atenção na caracterização das microemulsões.

À Universidade Federal do Piauí — UFPI — por me permitir executar a pesquisa, cedendo os espaços dos laboratórios (DERMOFARMÁCIA e MICROBIOLOGIA), equipamentos e substâncias necessárias.

## RESUMO

O fungo *Candida albicans* se desenvolve na cavidade oral. Os idosos se tornam mais vulneráveis devido a fatores diversos, a citar a baixa imunidade ocasionada, muitas vezes, pelo baixo nível nutricional, o que repercute na saúde geral do indivíduo. O *C. albicans* é considerado fator etiológico relevante da estomatite protética. São vários os antifúngicos orais disponíveis, dentre os quais vêm se destacando os que são produzidos contendo ativos de plantas medicinais. Dentre estes vegetais, chama a atenção de pesquisadores a *Lippia origanoides*, cuja cromatografia gasosa identificou três picos de relevância, permitindo elencar como componentes majoritários Tymol, Cymene e Carvacrol, com ação antimicrobiana. Nesta pesquisa, foram desenvolvidos sistemas microemulsionados, à base de óleo essencial de *L. origanoides* e realizados testes para verificar suas eficácias antimicrobiana, *in vitro*, tendo como alvo *C. albicans*. Foram preparadas quatro microemulsões contendo concentrações diferentes do óleo essencial de *L. origanoides* (OELo), que foram denominadas ME1 (1%); ME2 (2%); ME3 (4%) e ME4 (6%). No preparo das microemulsões foram utilizadas as seguintes substâncias: labrosol®, plurol®, miristato de isopropila®, água destilada e OELo®. Considerando que as microemulsões foram obtidas com o uso de um tensoativo predominantemente hidrofílico e o teor de água superior ao de óleo, todas as formulações desenvolvidas foram consideradas do tipo água e óleo (A/O). O OELo se solubilizou adequadamente nos sistemas microemulsionados, exceto a de concentração 6%. As microemulsões foram analisadas quanto as características organolépticas cor, aspecto, odor, e características físico-químicas pH, densidade, potencial zeta, tamanho de partículas e o índice de polidispersão. A atividade antimicrobiana das microemulsões formuladas foi avaliada pela técnica de difusão em disco, frente a cepa de *C. albicans* ATCC 10231. Todas as preparações testadas demonstraram ação inibitória contra esta levedura, quando comparadas ao controle positivo AmB (anfotericina B- halo 13 mm), apresentando halos inibitórios que variaram entre 17 mm a 18,3 mm. Estes dados foram confirmados em testes complementares com os corpos de prova feitos com resina para base de prótese dentária colonizados pelo fungo *C. albicans*, fato verificado através das contagens de UFC, peso seco e das correlações de UFC e do peso seco com a concentração

do ativo. De acordo com os resultados mostrados acima, conclui-se que as microemulsões formuladas com o ativo OELO são eficientes, em testes *in vitro*, na inibição do crescimento do fungo *C. albicans*. Verificou-se que as MEs a 2% e 4% foram mais eficientes.

**Palavras-chave:** Antifúngicos. Idosos. Plantas medicinais. Sistemas microemulsionados.

## ABSTRACT

The *Candida albicans* fungus develops in the oral cavity, especially in the elderly. It is considered the most relevant etiological factor of denture stomatitis. There are several types of antifungals available, among which those produced with active ingredients from medicinal plants stand out. Among these vegetables, *Lippia origanoides* has drawn the attention of researchers. Gas chromatography of the essential oil identified three peaks of relevance, allowing the listing of tymol, cymene and carvacrol as natural components, with antimicrobial action. In this research has as general objective to develop microemulsion systems based on *L. origanoides* essential oil and to tests their antimicrobial efficacy, *in vitro*, in biofilm that forms on the surface of oral prosthesis (OP), targeting *C. albicans*. Four microemulsions were prepared containing different concentrations of the essential oil of *L. origanoides*, which were named ME1 (1%); ME2 (2%); ME3 (4%) and ME4 (6%). In the preparation of microemulsions, labrosol, plurol, isopropyl myristate, distilled water and essential oil of *L. origanoides* were used. Considering that the microemulsions were obtained using a predominantly hydrophilic surfactant and that the water content was higher than that of oil, all formulations developed were considered to be of the water and oil (W/O) type. The essential oil of *L. origanoides* was adequately solubilized in the microemulsion system, except for the 6% concentration. The microemulsions were analysed for organoleptic characteristics color, appearance, odor and physicochemical characteristics pH, density, zeta potential, particle size and polydispersity index. In the antifungal activity tests, all microemulsions were effective against the *C. albicans* fungus, when compared to the positive control AmB (amphotericin B — 13mm halo), presenting the following inhibitory halos in mm: ME1 (1%) — 17mm; ME2 (2%) — 18mm; ME3 (4%) — 17,3mm and ME4 (6%) — 18,3mm.

Such data were confirmed in complementary through the counts of CFU and dry weight and the correlations of CFU and dry weight with the concentration of the active. According to the results show above, it was concluded that the microemulsions formulated with the active essential oil of *L. origanoides* are efficient, *in vitro* tests, in inhibiting the growth of the fungus *C. albicans*. It was verified that the 2% and 4% microemulsions were the most efficient.

**Keywords:** Antifungal. Elderly. Medicinal plants. Microemulsions systems

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características botânicas da planta <i>Lippia origanoide</i> .....	34
Figura 2 – Estrutura das MEs direta (O/A) e inversa (A/O) .....	37
Figura 3 – Cromatografia do OELO pela análise GC-MS .....	50
Figura 4 – Aspecto visual das MEs formuladas nesta pesquisa.....	51
Figura 5 – Placa de Petri contendo colônias do fungo <i>C. albicans</i> .....	54
Figura 6 – Halos de inibição formados ao redor de discos .....	55
Figura 7 – Preparação dos corpos de prova e indução do biofilme .....	56
Gráfico 1 – Avaliação da inibição do biofilme pelas MEs .....	57
Gráfico 2 – Correlação UFC x concentração do OELO .....	58
Gráfico 3 – Correlação peso seco x concentração do OELO .....	58
Quadro 1 – Estudos sobre atividade antifúngica de fitoterápicos .....	33
Quadro 2 – Substâncias usadas no preparo das MEs .....	40
Quadro 3 – Descrição da metodologia usada na preparação das MEs .....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Composição química do OELO .....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 2 – Determinação das concentrações (%) dos componentes das formulações .....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 3 - Propriedades organolépticas dos SMEs.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 4 – Valores de pH e de densidade dos SMEs.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 5 – Valores das dimensões de partículas, potencial zeta, índice de polidispersão das MEs com OELO.....</b>	<b>53</b>
<b>tabela 6 – Valores em tamanho dos halos de inibição para avaliação da atividade antifúngica de MEs contendo OELO .....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amarelo
AC	Amarelo-Claro
AE	Amarelo-escuro
AM	Amarelo Médio
ANOVA	Analysis of Variance
A/O	Água e Óleo
AmB	Amphotericin B
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collections
BHI	Brain Heart Infusion Collections
C.	Característico (odor do OELo)
CG	Cromatografia Gasosa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DO	Densidade Óptica
EM	Espectrofotômetro de Massa
eV	Eletro-volt
HO	Homogêneo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LADERMO	Laboratório de Dermofarmácia
LDEP	Laboratório de Demografia e Estudos Populacionais
ME/MEs	Microemulsão / Microemulsões
MOELo	Microemulsão de óleo Essencial de <i>Lippia organoides</i>
nm	nanômetro
OELo.	Óleo Essencial de <i>Lippia organoides</i>
O/A	Óleo e Água
pH.	potencial Hidrogeniônico
PDR	Prótese Dental Removível
PPR	Prótese Parcial Removível
PTR	Prótese Total Removível

RPM	Rotação Por Minuto
S/A	Sociedade Anônima
SB	Saúde Bucal
SLF	Sistema de Liberação de Fármacos
SMEs	Sistemas Microemulsionados
UFC	Unidade Formadora de Colônia
YPD	Yeast Peptone Dextrose

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
g	Grama
° C	Grau Celsius
mL.	mililitros
g	Microgramas
d	Densidade
$m_0$	massa do picnómetro vazio
$m_1$	massa do picnómetro com água
$m_2$	massa do picnómetro com a formulação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Dificuldades encontradas por idosos na manutenção da prótese dentária removível (PDR).....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Principais agentes que dificultam a preservação da PDR .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Principais microrganismos da cavidade oral formadores de biofilme.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Importância da <i>C. albicans</i> na saúde oral .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Estomatite protética (EP) .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Métodos de higienização para PDR .....</b>	<b>24</b>
2.6.1	Método Mecânico .....	25
2.6.2	Método Químico.....	25
2.6.3	Método Combinado .....	26
<b>2.7</b>	<b>Soluções higienizadoras para PDR .....</b>	<b>26</b>
<b>2.8</b>	<b>Tratamentos alternativos à base de fototerápicos para uso Dentário .....</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Alternativas higienizadoras para PDR contendo ativos de plantas com atividade anti-<i>candida</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>2.10</b>	<b>Características etnobotânicas da <i>I. origanoides</i>, kuth (Verbenaceae).....</b>	<b>31</b>
<b>2.11</b>	<b>Características e utilidades dos óleos essenciais (OEs).....</b>	<b>33</b>
<b>2.12</b>	<b>Microemulsões (MEs): estrutura e importância farmacológica.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Características do OELO por cromatografia gasosa acoplada à espectômetro de massa (CG-EM) .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Preparo dos sistemas microemulsionados. ....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Caracterização das microemulsões.....</b>	<b>38</b>
4.3.1	Características organolépticas .....	38
<b>4.3.2</b>	<b>Características físico-químicas .....</b>	<b>38</b>

4.3.2.1	<b>Verificação de pH</b> .....	39
4.3.2.2	<b>Densidade</b> .....	39
4.3.2.3	<b>Potencial Zeta e Tamanho das Partículas</b> .....	40
4.3.2.4	<b>Índice de Polidispersão</b> .....	40
4.4	<b>Avaliação da atividade antifúngica</b> .....	42
4.4.1	Antifungigrama Pelo Método Disco-Difusão .....	43
4.4.2	Corpos de Prova.....	43
4.4.3	Teste de Formação de Halo e Inibição de Biofilme .....	44
4.4.3.1	<b>Teste em Difusão em Agar</b> .....	44
4.4.3.2	<b>Formação do Biofilme</b> .....	45
4.4.3.3	<b>Determinação do Peso Seco do Biofilme</b> .....	46
4.5	<b>Análise estatística</b> .....	46
5	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	46
5.1	Composição do OELO .....	46
5.2	Cromatograma do OELO .....	47
5.3	Preparação dos sistemas microemulsionados .....	48
5.4	Características organolépticas e físico-químicas das MEs .....	48
5.5	Avaliação da atividade antifúngica .....	51
5.6	Tratamento do biofilme com os sistemas microemulsionados .....	55
5.6.1	Peso seco do Biofilme .....	52
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

Idosos vivem, nas diferentes classes sociais, uma forma diversificada de vida, como se a aproximação do fim de suas existências promovesse as desigualdades sociais. Segundo o Laboratório de Demografia e Estudos Populacionais (LDEP) (2020), o número de brasileiros idosos de 65 anos e mais era de somente 1,6 milhões em 1950, passou para 9,2 milhões em 2020 e deve alcançar 61,5 milhões em 2.100. O crescimento absoluto está estimado em 38,3 vezes. Em termos relativos, a população idosa de 65 anos e mais representava 3% do total de habitantes em 1950, passou para 9,6% em 2020 e deve atingir mais de um terço (34,6%) em 2.100 (um aumento de 11,5 vezes no percentual de 1950 para 2.100) (LDEP, 2020). Com isso, doenças próprias deste segmento ganharam mais expressão devido o aumento das doenças crônicas e degenerativas.

Esta situação apresenta como resultado sequelas de doenças que requerem tratamentos cada vez mais complexos para a recuperação e a reabilitação da saúde oral, devido ao grande número de perdas dentárias (BRASIL, 2011). Por sua relevância, a reabilitação protética necessita de prognóstico alicerçado no correto diagnóstico e em um planejamento minucioso (ARRUDA *et al.*, 2020). A prevalência de edêntulos no Brasil é alta, principalmente entre a população idosa. Projeções futuras verificam um crescimento até 2040, com expectativa de 64 milhões de idosos edêntulos no país (CARDOSO *et al.*, 2016).

Diante das dificuldades vivenciadas pela população de idosos, restaurações fixas e removíveis de implantes podem apresentar um desafio para os que são dependentes, tanto no manuseio da prótese quanto na sua limpeza (MULLER, 2016). Assim, o uso excessivo de fármacos sintéticos propicia o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes (ANDRADE *et al.*, 2012). Portanto, há necessidade do desenvolvimento de fármacos naturais de maior eficácia e, nesse contexto, surge a utilização de fitoterápicos como tratamento alternativo. Os mesmos diferem dos sintéticos por apresentarem uma diversidade molecular superior proporcionando novas descobertas, com pesquisa nas atividades biológicas que podem favorecer na prevenção e tratamento de doenças (ANDRADE *et al.*, 2012).

Neste contexto, as plantas medicinais são notórias devido à presença de substâncias que conferem aos óleos essenciais e extratos propriedades

antimicrobianas, que são reconhecidas, há séculos, e comprovadas pela ciência (DUARTE, 2006). A *Lippia origanoides* popularmente conhecida como alecrim-pimenta, está entre as plantas com potencial de uso farmacológico na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), publicada em janeiro de 2009 pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2009). A *L. origanoides* é um arbusto encontrado em várias regiões do Brasil, aromático, de uso medicinal popular, usada principalmente como antisséptico (COSTA *et al.*, 2002). Do alecrim-pimenta é extraído óleo essencial (OE), que é rico em Timol, responsável pelo odor característico, o Carvacrol e outros, que conferem ao OE propriedades bactericida, fungicida, moluscida e larvicida (LEAL *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2008).

A atividade antimicrobiana do OE e de extratos de *L. origanoides* contra vários fungos, bactérias e outros microrganismos já foi comprovada por diversos autores (SILVA *et al.*, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012). Entre os microrganismos mais estudados estão: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Entamoeba coli*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

A atividade antimicrobiana do timol e do carvacrol tem sido demonstrada por pesquisas diversas (PASCUAL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2013). As substâncias citadas parecem tornar a membrana da célula permeável, e são capazes de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas (BURT, 2004). Oliveira *et al* (2007) constataram a ação antimicrobiana do OE de um quimiotipo de *L. origanoides* rico em carvacrol, frente a *C. albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neforms* sorotipo A, entre outros.

Considerando o potencial biológico anteriormente citado da *L. origanoides* e a importância de alternativas aos antifúngicos sintéticos disponíveis, esta pesquisa utilizou o Óleo Essencial de *L. origanoides* (OELo) através da tecnologia dos sistemas microemulsionados, preparados em diferentes concentrações (%), avaliando-se sua atividade antimicrobiana frente ao fungo *C. albicans*. A resposta inflamatória frente à infecção por *Candida* apresenta uma íntima relação entre os hábitos de higiene oral, limpeza da prótese dentária e o comportamento da levedura, sendo a higienização adequada da prótese um fator de redução da prevalência da colonização da cavidade oral (da SILVA *et al.*, 2018). Assim, a adoção do uso de

antifúngicos frente à *Candida* da superfície da prótese dentária é imprescindível para prevenção e tratamento de infecções (TASSO, 2019).

A *Candida* é, provavelmente, o maior patógeno oportunista que coloniza a espécie humana. Sabe-se que habita, inofensivamente, vários nichos do corpo humano, incluindo a cavidade oral. Entretanto, sob determinadas circunstâncias, a *Candida* pode causar infecção da membrana mucosa externa e patologias sistêmicas que põem em risco a vida do indivíduo (SENEVIRATNE *et al.*, 2008). A transição de *Candida* como patógeno comensal inócuo para causador de infecção fúngica pode depender do estado imune do hospedeiro. Isso verifica-se, por exemplo, em pacientes com VIH/SIDA, transplantados, pacientes sujeitos a quimio e radioterapia, ou pacientes medicados com fármacos de efeito imunossupressor. Um dos fatores relevantes que otimiza a virulência da *Candida* é a sua versatilidade na adaptação à diversidade de habitats para colonização, formando comunidades microbianas aderidas a superfícies, conhecidas como biofilmes (SENEVIRATNE *et al.*, 2008).

Portanto, esta pesquisa pretende desenvolver microemulsão higienizadora para prótese dental removível (PDR) total ou parcial, eficiente na prevenção e no combate à *C. albicans*, tendo como ativo o OELo. Com isso, pretende-se oferecer ao público que usa PDR total ou parcial, um produto de fácil manuseio (spray), acessível, de produção simples, com baixo custo energético, que não promova resistência microbiana e que tenha baixa citotoxicidade e genotoxicidade.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Dificuldades encontradas por idosos na manutenção de prótese dentária removível (PDR)**

É considerado idoso o indivíduo com idade igual ou superior a 65 anos em países desenvolvidos, prevalecendo ainda em países em desenvolvimento a referência dos 60 anos (DOLAN *et al.*, 2005; HEBLIN *et al.*, 2007), como no Brasil. O envelhecimento tende a ser delicado e doloroso para muitos idosos. Com frequência, eles se veem frente ao isolamento, à falta de apoio familiar e à dificuldade em lidar com o próprio processo de envelhecimento. Nesse contexto, merece destaque o envelhecimento com dependência, pois essas pessoas

demandam muitos cuidados e responsabilidades que implicam disponibilidade e tempo de seus familiares e/ou cuidadores (DAVIM *et al.*, 2004).

A população idosa, em geral, representa uma faixa etária de risco de doenças e de acesso limitado aos cuidados de saúde oral por múltiplos fatores, a citar os econômicos e psicossociais (PYLE & STOLLER, 2003). Particulariza-se o caso de idosos institucionalizados, no qual se verifica um pior estado de saúde oral associado ao cuidado mínimo de higiene oral (KANDELMAN *et al.*, 2008) e à restrição dos cuidados médico-dentários apenas em situações emergenciais e não à serviço da manutenção dentária (PATIL & PATIL, 2009; PELTOLA *et al.*, 2004).

Ademais, pode-se elencar outras causas da debilitação oral associada à negligência da higiene, como: baixo nível de escolaridade, doenças sistêmicas (PETERSEN & YAMAMOTO, 2005; PATIL e PATIL, 2009), residência em áreas rurais (SAUNDERS & MEYCROWITZ, 2005), tornando-se mais complicada pelo aparecimento de alterações associadas ao envelhecimento, como a diminuição na capacidade visual, destreza e cognitiva (CHALMERS & ETTINGER, 2008). Associadas a essas causas, pode-se destacar as diversas doenças que têm manifestação na saúde oral, como é o caso da demência e a doença de Alzheimer, nas quais as habilidades motoras os tornam incapazes de efetuarem a higiene oral (KANDELMAN *et al.*, 2008).

A manutenção de próteses dentárias em pessoas da terceira idade deve ser algo dinâmico e sistêmico visto que alterações na saúde física e mental são frequentes. Diante disto, o acompanhamento odontológico após a colocação da prótese dentária é fundamental para a longevidade da prótese e saúde do paciente.

O envelhecer torna o indivíduo vulnerável a várias doenças. Aqui, destaca-se as que acometem a cavidade oral decorrentes das mudanças anátomo-fisiológicas inerentes da idade (REZENDE, 2005; BORAKS, 2002). Segundo Alencar *et al* (1994), todos os tecidos da cavidade oral sofrem atrofia e perda da elasticidade desde a mucosa até as estruturas ósseas, passando pelos tecidos de sustentação e estruturas musculares.

Algumas dessas alterações são resultantes das manifestações de patologias sistêmicas, deficiências nutricionais, efeitos colaterais devido ao uso recorrente de fármacos, que afetam o funcionamento dos tecidos periodontais, na dentição, nas glândulas salivares e mucosas orais (PEREIRA *et al.*, 2004). Cárie coronária e radicular, perdas dentárias, atrições, erosões, abrasões, periodontopatias,

edentulismo, desgastes dentários, lesões de tecidos moles, xerostomia, dores orofaciais, desordens temporomandibulares, problemas de oclusão e câncer oral, entre outras, são relatados como problemas de saúde oral mais prevalentes no idoso (PUCCA Jr. 1996; AUSTREGÉSILO *et al.*, 2015).

Diante do exposto, as extrações dentárias se tornam inevitáveis, o que leva o indivíduo a submeter-se à implantação de prótese dentária. No entanto, a falta de orientações e assistência odontológica posterior à implantação da prótese dentária removível (PDR) é um dos fatores que justificam os altos índices de lesões associadas às mesmas (DAJANI, 1997).

## **2.2 Principais agentes que dificultam a preservação da PDR**

O uso contínuo de prótese dentária provoca a degeneração das glândulas salivares e a diminuição da secreção salivar, favorecendo o acúmulo de biofilme que, por sua vez, reduz o pH salivar levando à proliferação fúngica que, em associação com fatores mecânicos, químicos ou biológicos que permanecem por longos períodos de utilização ininterrupta da prótese dentária, podem desencadear lesões (ELIASSON *et al.*, 1992; JEGANATHAN & LIN, 1992; MORAES, 1994 *apud* CASTRO *et al.*, 2006).

Dos microrganismos que compõem a microbiota oral, destaca-se o fungo *Candida* spp, que tem a capacidade de adesão à resina acrílica da base das próteses, colonizando-a profundamente (DAVENPORT, 1970; BUDTZ-JORGENSEN, 1990; CHAU *et al.*, 1995), sendo geralmente associado à estomatite protética (EP). A literatura também revela que após a instalação de prótese dentária ocorre um aumento nos níveis de *Streptococcus mutans* na cavidade oral (ROCHA *et al.*, 2003). Vale ressaltar que muitos dos microrganismos (mais de 700 espécies) que habitam a cavidade oral, vivem em harmonia, mantendo a homeostase da região (ZARCO *et al.*, 2012; GLURICH *et al.*, 2014). No entanto, quando há um desequilíbrio da microbiota oral, os microrganismos residentes associados com a etiologia de alterações orais como a doença da cárie e a doença periodontal, promovem alterações sistêmicas, principalmente infecções do trato respiratório (GLURICH *et al.*, 2014).

### 2.3 Principais microrganismos da cavidade oral formadores de biofilme

Nos últimos anos têm sido feitos muitos estudos voltados para o conhecimento do microbioma oral, pois antes de se estudar qualquer doença infecciosa, é imprescindível decifrar e conhecer a composição do microbioma em indivíduos saudáveis. Estudos revelam que os microrganismos mais abundantes no microbioma oral saudável pertencem aos filos Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacterias e Actinobacteria. *Streptococcus* é o mais predominante, seguido por *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria* e *Haemophilus* (WANG & GANLY, 2014).

Bactérias como *Streptococcus*, entre outras, colonizam locais da cavidade oral favorecendo a formação de biofilme mantendo o equilíbrio do ecossistema. Quando deixa de haver este equilíbrio, a saúde oral fica comprometida e ocorre doenças. As duas doenças orais mais comuns no ser humano são as conhecidas cáries dentárias e as doenças periodontais. O desequilíbrio deste ecossistema pode também desencadear outras doenças como pericardite, pneumonias e úlceras gástricas (JENKINSON, 2011; WADE, 2012).

*Streptococcus mutans* é também importante agente etiológico da cárie dentária em humanos e fatores de virulência, tais como a composição de sua superfície celular e a produção de bacteriocinas, têm sido investigados em relação à sua cariogenicidade (RODRIGUES *et al.*, 2008). A capacidade de adesão desse microrganismo está relacionada à sua patogenicidade sendo, portanto, objeto de estudos que visam prevenir a formação de lesões de cárie, seja por meio de métodos mecânicos, como a utilização da escova dental, ou químicos, como a utilização de agentes antimicrobianos (PEREIRA, 2005; SAWHNEY & BERRY, 2009). *S. mutans* habita as superfícies da cavidade oral, sendo parte principal dessa microbiota (LOESCHE, 1982). Tal fato tem sinalizado para muitos pesquisadores nesta área, em especial à identificação e caracterização desses microrganismos, em seus aspectos morfológicos, bioquímicos, genéticos e sorológicos.

Por outro lado, doença que se destaca é a candidíase oral, causada pelo fungo *C. albicans*. Não se trata de uma enfermidade grave, mas se torna importante, pois níveis elevados deste microrganismo afeta o paladar e a deglutição, comprometendo a alimentação, principalmente nos casos de pacientes imunocomprometidos, hospitalizados e idosos. A candidíase oral representa porta de entrada para complicações, como candidíases orofaríngeas, esofágicas,

laringeanas e sistêmicas (URIZAR, 2002; PERAZZO *et al.*, 2004). Extremos de idade (recém-nascidos e idosos), uso de próteses dentárias, tabagismo, entre outros, são alguns dos fatores que predispõem a candidíase oral (URIZAR, 2002).

#### **2.4 Importância da *C. albicans* na saúde oral**

O mais importante microrganismo na patogênese da candidíase é a *C. albicans*, e está presente na flora normal da cavidade oral. Uma situação de parasitismo ocorre quando existe um desequilíbrio entre o hospedeiro e o fungo (CARLO *et al.*, 2015). Etiologicamente, *C. albicans* é o agente mais comum associado a infecções fúngicas orais e corresponde, aproximadamente, a 80% de todos os microrganismos isolados das lesões orais (JAVED *et al.*, 2014). Prevê-se a virulência da *Candida* spp conforme o nível de adesão às células epiteliais e endoteliais, a habilidade de mudar de fenótipo (levedura para filamento), e a capacidade de secretar proteases para facilitar a penetração celular (HUBER & TERÉZHALMY, 2011).

A patogenicidade da *Candida* também se deve à formação de hifas ou pseudo-hifas com mais de 200 µm de comprimento, representando uma barreira à fagocitose; produção de metabólitos que podem provocar reações alérgicas (TOZZO & GRAZZIOTIN, 2012). Acrescenta-se, ainda, mudanças morfológicas; alterações morfogenéticas que, acredita-se, são provocadas por fatores ambientais. Estas alterações resultam na formação do micélio, o qual está associado à evolução dos estados patológicos (SARDI *et al.*, 2013). Considerando os aspectos macroscópicos, a *C. albicans* é caracterizada primariamente pela morfologia colonial úmida, cremosa e odor específico, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelado em meio de cultura Ágar Sabouraud, formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade fermentativa (LU *et al.*, 2004).

*C. albicans* é um organismo oportunista (PETERS *et al.*, 2012; MAYER *et al.*, 2013) que, na maioria dos indivíduos, vive como um comensal em diversas áreas do corpo (MAYER *et al.*, 2013; PETERS *et al.*, 2013; O'DONNELL *et al.*, 2015). Esta levedura é capaz de formar colônias em vários polímeros utilizados para a confecção de dispositivos médicos e odontológicos, tais como materiais dentários, próteses, tubos endotraqueais e cateteres (KOJIC *et al.*, 2004; HARRIOT *et al.*,

2009) e produzir biofilmes de erradicação complexa (HARRIOT *et al.*, 2009; PETERS *et al.*, 2010; O'DONNEL *et al.*, 2015; O'DONNEL *et al.*, 2016).

O fungo *C. albicans* pode contribuir para a formação de biofilme, que consiste em uma comunidade de microrganismos que se ligam irreversivelmente a uma determinada superfície (material inerte ou tecidos vivos), produzindo polímeros extracelulares que fornecem uma matriz estrutural (LEWIS, 2001; DONLAN, 2001). Os microrganismos desse tipo de comunidade apresentam menores taxas de crescimento e maior resistência ao tratamento antimicrobiano, comportando-se de forma muito diferente das células planctônicas (DONLAN, 2001). Uma única espécie microbiana é capaz de formar biofilme, embora uma mistura de espécies bacterianas e fúngicas esteja geralmente por trás da formação de biofilme *in vivo* (DOUGLAS, 2002; O'TOOLE *et al.*, 2000).

Devido às características gerais citadas, os biofilmes potencializam o estabelecimento de abrigos inflexíveis no hospedeiro humano. É o caso dos biofilmes formados por espécies de *Candida*, causando infecções fúngicas e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (SIMS *et al.*, 2005). Essas espécies são muito difíceis de tratar devido às suas características: resistência a drogas antifúngicas, expressão de fatores de virulência e capacidade de formar biofilme (GANGULY & MITCHELL, 2011).

Ainda sobre a *C. albicans*, estudos relacionam a *Candida* spp. entre os principais patógenos orais causadores da estomatite protética (EP) por prótese dentária; entretanto, o conhecimento sobre quais fatores de virulência favorecem o aparecimento desses fungos necessitam ser analisados com cautela. A influência do biofilme pode determinar o curso da EP (PEREIRA-CENCI, 2008; RADFORD *et al.*, 1999), cuja descrição verifica-se a seguir.

## **2.5 Estomatite protética (EP)**

Vários autores, como Braganet *et al.* (2002); Fuentesfria *et al.* (2010); Bianchi *et al.* (2016) afirmaram que entre as patologias mais associadas ao uso de próteses removíveis é a EP, sendo esta uma das formas de apresentação da candidíase oral, cuja alteração afeta aproximadamente dois terços dos portadores de aparelhos protéticos, resultando em lesões no paciente, incluindo sangramento, dor e desconforto que, se não for tratado adequadamente, pode tornar inviável o uso de

próteses, visto que compromete diretamente a saúde geral e a qualidade de vida dessas pessoas (GARDIZANE *et al.*, 2016; RIVERA *et al.*, 2017).

A EP é uma das formas de candidíase que se caracteriza por lesão inflamatória na mucosa oral que tem sido considerada a lesão mais observada em usuários de próteses dentárias removíveis (PDR), apresentando uma prevalência de 60 a 72% (WEBB *et al.*, 2005) e, geralmente, está associada à presença de candidíase eritomatosa (BATISTA *et al.*, 1999), que consiste em uma variedade de síndromes clínicas causadas por um fungo *Candida* (ÁLVARES *et al.*, 2007). Vários são os fatores predisponentes. Dentre eles, podemos citar: próteses intraorais, deficiências nutricionais, doenças metabólicas, uso de antibióticos, deficiência fisiológica das glândulas salivares e imunossupressão (KLEINNEGGER *et al.*, 2001). A presença de dispositivos orais como próteses e aparelhos ortodônticos podem alterar o nicho oral, promovendo modificações nas características físicas e biológicas da saliva e também em estruturas orais, podendo causar um desequilíbrio na biota oral (CAMPBELL, 2003). A prótese pode interferir ou contribuir para a detecção de processos clínicos ou subclínicos resultantes da interação entre a mesma e os microrganismos e, muitas vezes, está relacionada com o aparecimento de lesões como: úlceras traumáticas, hiperplasias mucogengivais e candidíase oral (GOIATO *et al.*, 2005). A higienização e desinfecção diárias de próteses dentárias removíveis são necessárias para a promoção da saúde e a conservação dos tecidos orais e, a manutenção da mucosa saudável está relacionada ao grau de limpeza das próteses em contato com os tecidos orais (BIANCHI *et al.*, 2016).

A forma convencional de tratamento da EP consiste na prescrição de antifúngicos alopáticos de uso tópico. Entre esses fármacos destacam-se dois grupos: os derivados poliênicos e azólicos (CAMPAGNOLE *et al.*, 2004). Os derivados poliênicos, Nistatina e Anfotericina B, possuem, de modo geral, o mesmo mecanismo de ação: inibem a síntese de ergosterol em fungos patogênicos, aumentando a permeabilidade da membrana celular e, como consequência, ocorre a perda dos constituintes citoplasmáticos (CAMPAGNOLE *et al.*, 2004). A Nistatina e a Anfotericina B são efetivos contra a maioria das inflamações causadas pelas espécies de *Candida spp* (TAVARES, 2001). Entre os derivados azólicos estão Cetoconazol, Itraconazol, Fluconazol e Miconazol, que agem de forma similar aos derivados poliênicos. Estes medicamentos são indicados para quadros graves de

candidioses severas da cavidade oral ou com envolvimento do trato orofaríngeo (ANDRADE, 1999).

Os medicamentos alopáticos citados estão disponíveis na forma de suspensão para bochechos, podendo ser deglutidos, enquanto outros têm formulações em comprimidos, ou cápsulas. Porém, as apresentações farmacêuticas na forma de suspensões podem ser consideradas de sabor desagradável, podendo ainda resultar em náuseas e vômitos. A Anfotericina - B, de uso parenteral, é reservado para casos sistêmicos graves e possui efeitos colaterais como febre, calafrios, náuseas, diminuição da função renal com elevação da concentração da ureia e creatinina e redução dos níveis de potássio (MARQUES & CAMARGO, 1998). Uma vez que os tratamentos alopáticos sintéticos podem trazer complicações, como as citadas acima, a ocorrência da doença é frequente devido à desistência do tratamento por parte do paciente. Além disso, tem sido relatado que as espécies de *Candida* podem desenvolver resistência aos medicamentos citados (MENEZES *et al.*, 2009).

Assim, é importante ressaltar que a confecção de próteses novas, corretamente acrilizadas e ajustadas, controles periódicos, métodos eficientes de desinfecção e remoção noturna da prótese são medidas preventivas (CUNHA & MACHINI, 2007; SESMA *et al.*, 2005). Quando a patologia já está ativa, um tratamento curativo deve ser prescrito pelo profissional da odontologia, que deve avaliar a situação da cavidade oral, descrever e orientar o tratamento com antifúngicos.

## **2.6 Métodos de higienização para PDR**

A prótese dentária tem por fim restabelecer no usuário a função e a estética perdidas. Porém só é possível se as etapas de confecção e preservação dos trabalhos protéticos forem adequadamente realizados. Na prática odontológica verifica-se com frequência lesões nos tecidos orais originadas do uso de prótese cuja confecção foi inadequada ou até mesmo de orientação insuficiente ao paciente pelo cirurgião dentista quanto ao uso e higienização das mesmas (GOIATO *et al.*, 2005).

As próteses dentárias podem ser fixas na cavidade oral ou removíveis. Estas, podem ser parciais (próteses parciais removíveis - PPR) ou totais (próteses totais

removíveis – PTR) (PHOENIX, 2003). A implantação de uma prótese removível provoca alteração quantitativa e qualitativa da placa bacteriana, aumentando os processos inflamatórios da cavidade oral (FONSECA, 2007). A falta de informação sobre a confecção, uso e manutenção das próteses dentárias removíveis ainda é fato presente no meio odontológico. Pacientes idosos, por apresentarem várias características orais e sistêmicas peculiares, como rebordo alveolar reduzido, mucosa menos resiliente, tecido muscular em degeneração, exigem maior precisão na adaptação de suas próteses aos tecidos orais (SOUZA & TAMAKI, 1996).

Verifica-se, portanto, o quão é importante manter esta parcela da população sob os cuidados de políticas públicas efetivas e eficientes e, ainda, um acompanhamento sistemático dos profissionais da odontologia em relação aos usuários de próteses dentárias, em especial no que se refere aos métodos de higienização das próteses e dos tecidos orais, com a finalidade de prevenir patologias bem como promover a longevidade das mesmas. Neste contexto, encontram-se, precariamente disponibilizados no mercado, materiais destinados a esse fim. Dentre os métodos de higienização para as PDR, há três métodos, descritos a seguir.

### 2.6.1 Método mecânico

O método mecânico consiste em realizar a limpeza com uma escova de dente apropriada, associada ao dentífrico não abrasivo ou sabão neutro. É o mais usado devido ser simples e de baixo custo, porém requer habilidade manual e, muitas vezes, as cerdas não alcançam nichos profundos (SILVA & SEIXAS, 2008). Diante disto, estudos recomendam que este método seja associado a outro (SESMA *et al.*, 1999). Ultrassom também é considerado um método mecânico alternativo para desinfecção de próteses, cujo funcionamento consiste na conversão de energia elétrica em energia mecânica, com frequência de 20.000 ciclos/segundos. É eficiente na remoção do cálculo, da placa bacteriana e manchas que se formam pela ingestão do café e pelo tabagismo. O procedimento de limpeza se completa pela imersão da prótese em hipoclorito de sódio seguido de efervescentes comerciais (SHAY, 2000).

### 2.6.2 Método químico

O método químico consiste em imergir a prótese em substâncias químicas com propriedades solvente, detergente, microbocida/microbioestática, entre os quais pode-se destacar: hipoclorito de sódio, peróxidos alcalinos, ácidos e enzimas (KAZUO *et al.*, 2008).

### 2.6.3 Método combinado

Fundamenta-se na associação do uso de escova apropriada e dentifrício que não seja abrasivo ou sabão neutro, seguindo da imersão em uma solução química. É o método mais indicado por ser efetivo na higienização das próteses orais (SILVA, 2006). A escovação remove resíduos provenientes da alimentação e as soluções químicas atuam contra a microbiota não removida pela escovação, situada em regiões mais profundas (MARCHINI *et al.*, 2001).

É importante ressaltar a recomendação dos profissionais da saúde oral: A prótese deve ser removida quando o paciente for dormir, deixando-a imersa em um recipiente com água, pois permite o descanso dos tecidos orais e otimiza a circulação sanguínea da região, além do mais, ajuda a manter a integridade física da prótese (CUNHA & MARCHINI, 2007; SESMA *et al.*, 2005).

## 2.7 Soluções higienizadores para PDR

O usuário de PDR, para manter a integridade do aparelho ao longo do uso é de extrema importância a adaptação, o acompanhamento e a orientação do cirurgião dentista acerca dos cuidados com a desinfecção, higienização e armazenamento da mesma. Tais cuidados são indispensáveis também para manter a saúde dos tecidos orais, prevenindo o desenvolvimento de patologias (FONSECA *et al.*, 2007).

O mercado brasileiro disponibiliza as seguintes soluções higienizadoras para os usuários de prótese dentária removível:

A) *hipoclorito de sódio*, na forma de solução, que dissolve mucinas e outras substâncias orgânicas. É eficiente na remoção do biofilme, remoção de manchas e é capaz de eliminar microrganismos tanto em superfície como em profundidade, apresentando efeito bactericida e fungicida (COUNCIL, 1983; BUDTZ-JORGENSEN,

1979), mas apresenta desvantagens, como clareamento dos materiais constituintes da prótese, corrosão dos componentes metálicos e odor desagradável (PERACINI *et al.*, 2010);

B) *Peróxidos alcalinos*, são combinações químicas complexas de ingredientes ativos, disponíveis na forma de pó ou tabletes que, quando misturados com a água, tornam-se soluções alcalinas de peróxido de hidrogênio, liberando bolhas de gás oxigênio que fazem limpeza tanto química quanto mecânica, porém deixa resíduos capazes de provocar lesões nos tecidos orais (ABELSON, 1985);

C) *Ácidos*, geralmente soluções de ácido hidrocloreídrico ou associado a um ácido fosfórico, são efetivos na remoção de manchas e dissolvem componentes inorgânicos dos depósitos. Sua ação é rápida, mas podem causar acidentes durante o uso, visto seu caráter ácido, o que exige do usuário manuseio cuidadoso (SESMA *et al.*, 1999);

D) *Enzimas* (papaína, lipase, amilase, tripsina, maltase, protease e dextranase) que estão disponíveis na forma de tabletes solúveis em água, onde se encontram sozinhas ou combinadas. São eficientes para o controle da placa bacteriana, visto que atuam quebrando as mucoproteínas, glicoproteínas e mucopolissacarídeos. O gluconato de clorexidina é um antisséptico ativo contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, fungos, leveduras, anaeróbios facultativos e aeróbios. Inibe o desenvolvimento do biofilme. Em baixas concentrações, é bactericida. Sua desvantagem se verifica na formação de manchas amareladas e marrons, além do gosto amargo (BUDTZ-JORGENSEN, 1979).

Segundo Paranhos, Silva & Ito (2002), a higiene das próteses dentárias é falha. Para esses autores, a falta de orientação correta da higienização oral pelos cirurgiões-dentistas, as dificuldades relacionadas às características das próteses e a idade avançada dos pacientes, levando-os a uma diminuição da destreza manual, bem como a falta de divulgação e o custo elevado de produtos específicos para higienização das próteses, justificam a problemática da saúde oral observada. Neste contexto, busca-se por um produto de fácil uso, que seja eficaz na prevenção e remoção de biofilmes e de depósitos orgânicos e inorgânicos, bactericida e fungicida atóxico aos pacientes e de baixo custo (ABELSON, 1985; COUNCIL, 1983; JEGANATHAN *et al.*, 1997). Sabendo-se que as pesquisas com plantas medicinais dão origem a medicamentos com menores custos e em menor tempo (OLIVEIRA *et al.*, 2006), percebe-se os fitoterápicos como uma alternativa que pode vir a

solucionar/amenizar os problemas citados e que também atendem às características do que seja um produto ideal.

## 2.8 Tratamentos alternativos a base de fitoterápicos para uso dentário

Os chamados medicamentos fitoterápicos são preparações vegetais padronizadas que consistem de misturas complexas de uma ou mais substâncias presentes na planta que são preparadas adequadamente e, posteriormente, prescritos de acordo com a legislação vigente (DI STASI, 2007). De modo geral, os compostos fitoterápicos podem ser utilizados nas mais variadas fórmulas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, hidroalcoólicas e infusões, sendo estas últimas conhecidas como chás (FRANCISCO, 2010).

Neste contexto, os seres humanos têm procurado cura para doenças na natureza desde os tempos remotos. Até recentemente, o uso de fitoterápicos compreendia suplementos alimentares, bebidas energéticas, multivitaminas, massagens e produtos para perda de peso (PETROVSKA, 2012). No entanto, outras áreas da saúde têm se voltado para o uso de ervas. É o caso da odontologia que também começou a explorar as suas propriedades com o objetivo de aliviar a dor de dente, a inflamação da gengiva e as aftas (KUMAR *et al.*, 2013).

Pesquisas relacionadas a produtos naturais cresceram significativamente frente ao aumento pela busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e a biocompatibilidade, além de custos mais acessíveis à população (FRANCISCO, 2010; BORBA, 2006; MARTINS *et al.*, 2014). Antissépticos, antibacterianos, antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, antivirais e analgésicos derivados de plantas são de amplo interesse na odontologia (SINHA & SINHA, 2014; SOKOVIC, 2010; SIENKIEWICZ *et al.*, 2011), área onde os fitoterápicos vêm se expandindo, mediante crescentes comprovações da eficácia de seus extratos, tanto no monitoramento do biofilme dental quanto em outras afecções orais. Constata-se, portanto, que a odontologia se beneficia, pois, a flora brasileira é biodiversa (SOYAMA, 2007).

Plantas como a árvore de mostarda (*Salvadora persica*), cujas folhas têm sido usadas como bastões de mascar em muitas partes do mundo, com nomes diferentes. Algumas outras partes, como galhos finos, da planta também são usadas para manter a higiene oral. Folhas de eucalipto (*Eucalyptus*), sucos de cebola (*Allium*

cepa) e limão (*Citrus limonum*) são usados como gargarejos e para aliviar a dor de dente (SZYSZKOWSKA *et al.*, 2010). Outra planta pesquisada, a danshen (*Salvia miltiorrhiza*), também conhecida como sálvia vermelha, sálvia chinesa é uma planta da medicina tradicional chinesa que atenua reações inflamatórias e tumorais sem efeitos adversos consideráveis (CHEN *et al.*, 2014). Por causa de seus efeitos inibidores de crescimento das células cancerígenas, os extratos de danshen podem ser adequados como principais candidatos a medicamentos e agentes quimioterapêuticos no tratamento de câncer oral (THORTON *et al.*, 2013).

Estudos com chás mostram que estas infusões podem ser utilizadas para inibir o crescimento de microrganismos, a aderência às superfícies dentais e redução na produção de ácidos e polissacarídeos extracelulares (FRANCISCO, 2010). Espécies como o cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), romã (*Punica granatum*), malva (*Magnoliopsida*), tanchagem (*Plantago major*), amoreira (*Morus*), sálvia (*Salvia officinalis*), camomila (*Matricaria chamomila*), entre outras, são indicadas nos casos de gengivite, abscesso na boca, inflamação e aftas (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Estas plantas têm apresentado ação microbicida e microbioestática sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, constituintes do biofilme dental (PEREIRA, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006). O alho (*Allium sativum*) também tem mostrado propriedade antibacteriana, antifúngica e antiviral. Essa planta é um importante coadjuvante no tratamento de pacientes portadores de periodontites (JUIZ, 2010). Em destaque, o extrato de alho tem mostrado efeito antibacteriano sobre *S. mutans*, bactéria do biofilme associada ao surgimento da cárie dental (LEE, 2001). Outro fitoterápico com efeito sobre a atividade da *S. mutans* é o óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), além de apresentar atividade analgésica. O açai (*Euterpe oleracea*), produz um evidenciador (corante) de placa dental com eficiência de 90% superior a produtos comercializados tais como o verde de malaquita, a fuccina e a eritrosina (FRANCISCO, 2010).

Vários fitoterápicos têm sido adicionados aos dentífricos. No trabalho de Ditterich *et al.*, 2007, os autores avaliaram a atividade antimicrobiana de várias marcas comerciais de dentífricos com componentes terapêuticos. Dentre eles, podemos citar: Sorriso Herbal (própolis), Malvatricin anti-placa e anti-tártaro (tintura de malva), Colgate Herbal (camomila), Gessy (extrato de juá), Sorriso (juá e própolis) e Paradontax (tintura de mirra e camomila). Seus resultados mostraram que tanto o *Staphylococcus aureus* como a *Escherichia coli* são sensíveis aos

dentifícios estudados, além de apresentar ação inibitória para microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Portanto, deve-se ter atenção na seleção de ervas, considerando o efeito das mesmas nos tecidos orais, os mecanismos de ação e os efeitos colaterais (TAHERI *et al.*, 2011). Para isso, é necessário ter conhecimento adequado sobre este método alternativo no tratamento de patologias de modo geral.

## **2.9 Alternativas higienizadoras para pdr contendo ativos de plantas com atividade anti-*Candida***

Há tempos a literatura vem relatando que extratos de plantas apresentam atividade antimicrobiana sobre patógenos orais, principalmente contra a fungo *C. albicans* (KOO *et al.*, 2000a; VASCONCELOS *et al.*, 2006; SAMET *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2008, DA SILVA *et al.*, 2008; BRAGA *et al.*, 2008; ENDO *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011a; ALAVARCE *et al.*, 2015), patógeno geralmente associado à EP. Em geral, as plantas medicinais apresentam compostos que são ativos antimicrobianos e o interesse sobre o estudo desses ativos vem crescendo enormemente (ENDO *et al.*, 2010; ANIBAL *et al.*, 2013).

Além disso, o uso crônico de antifúngicos sintéticos resulta em efeitos hepatotóxicos e nefrológicos (LOMBARD & BUDTZ-JORGENSEN, 1993), podendo ocorrer também o surgimento de fungos resistentes, uma vez que certas patologias protéticas reincidem após a interrupção do tratamento (QUIRYNEN & BOLLER, 1995; BARBEAU *et al.*, 2003). Comparando-se com os antifúngicos convencionais, acredita-se que o tratamento de patologias antifúngicas utilizando fitoterápicos seja uma alternativa terapêutica isenta de efeitos contrários e/ou incapazes de causar interações medicamentosas (ERNEST *et al.*, 1995).

Conforme dito anteriormente sobre o uso alternativo de fitoterápicos, o Quadro 1, a seguir, compila estudos realizados com seis espécies de plantas medicinais nas quais foram encontrados ativos com atividade antifúngica frente à diferentes espécies de *Candida*. As mais estudadas foram: *Melaleuca atnerfolia* (árvore-de-chá), *Allium sativum* (alho) e *Ricinus communis* (mamona) (PEREIRA *et al.*, 2005).

**Quadro 1 - Estudos sobre atividade antifúngica de fitoterápicos contra espécies de *Candida***

<b>Autor (ano)/Espécie de <i>Candida</i></b>	<b>Planta (espécie)</b>	<b>Nome Popular</b>	<b>Controle</b>	<b>Suscetibilidade frente ao fitoterápico</b>
<b>Vazquez e Zawawi (2002)</b>	<i>Malaleuca artnerfolia</i>	Arvore de chá	Fluconazol	+
<b>Vasconcelos et al. (2003)</b>	<i>Punica granatum</i>	Romã	Miconazol	+
<b>Sabitha et al. (2005)</b>	<i>Allium sativum</i>	Alho	Clotrimazol	+
<b>Catalán et al. (2008)</b>	<i>Malaleuca artnerfolia</i>	Arvore de chá	Nistatina	+
<b>Paiva et al. (2009)</b>	<i>Uncaria tormentosa</i>	Unha de gato	Miconazol	+
<b>Wright et al. (2009)</b>	<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim limão	<i>Violeta genciana a 0,5%</i>	+
<b>Bakhshi et al. (2012)</b>	<i>Allium sativum</i>	Alho	Nistatina	+
<b>Pinelli et al. (2013)</b>	<i>Ricinus communis</i>	Mamona	Nistatina e Miconazol	+
<b>Salles et al. (2015)</b>	<i>Ricinus communis</i>	Mamona	<i>Solução salina 0,8%</i>	+

Fonte: FREIRE, (2016)

## **2.10 Características etnobotânicas da *L. origanoides*, Kuth (Verbenaceae)**

A família *Verbenaceae* corresponde a uma ampla variedade de plantas floríferas, caracterizadas como arbustos, árvores de pequeno porte, ervas, cipós ou trepadeiras lenhosas. Nesta família, são encontrados cerca de 34 gêneros e 1.150 espécies, ocorrendo na América do Sul, América do Norte e América Central, em países como Brasil, Venezuela, Equador, Colômbia, México e Estados Unidos,

especificamente em regiões tropicais e subtropicais (SMITH *et al.*, 2004; MARK *et al.*, 2010). No Brasil, são encontrados 16 gêneros e cerca de 200 espécies dessa família (SALIMENA *et al.*, 2015). Diversos táxons de *Lippia* são citados na literatura em pesquisas que vão desde sua composição química a testes biológicos (PASCUAL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A *L. origanoides* Kuth (Figura 1), popularmente conhecida como alecrim-pimenta, tem sido alvo de pesquisas por apresentar propriedades medicinais promissoras. Dentre elas pode-se destacar: efeito tóxico em células bacterianas, e atividade antimicrobiana no controle de vários patógenos, incluindo bactérias, fungos, vírus e formas evolutivas de protozoários (BARRETO *et al.*, 2014). Uma característica de grande importância, neste contexto é a presença dos químicos timol e carvacrol, ativos antimicrobiano descritos na literatura (RAJGOPAL *et al.*, 2015).

*L. origanoides* está na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), publicado em janeiro de 2009 pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2009).

Estudos realizados por Lemos *et al.* (1990, 1992) revelaram a presença de diferentes concentrações dos ativos químicos timol e carvacrol em várias espécies de *Lippia*. Além do estudo fitoquímico, a atividade antimicrobiana do óleo essencial da *L. origanoides* contra fungos e bactérias foi verificada. As folhas da *L. origanoides* produzem cerca de 4% de óleo essencial, com a seguinte composição: timol, teor variante entre 34,2 e 95%, e o carvacrol, monoterpenos fenólicos com considerável ação antibacteriana e antifúngica. Dentre estes, destaca-se a vulnerabilidade da *C. albicans* a esses compostos.

**Figura 1 - Características botânicas da *L. origanoides*: flores, folhas e galhos**



Fonte: Brasil (2004)

### **2.11 Características e utilidades dos óleos essenciais (OEs)**

Quando o assunto é biodiversidade, o Brasil merece destaque. Em se tratando de espécies da flora, exibe numerosas formas de plantas com características exuberantes não só no aspecto morfológico, mas também na variedade de substâncias farmacologicamente ativas. Neste contexto, merece alusão as essências naturais, por harmonizar propriedades odoríferas com o fato de serem biodegradáveis, apresentarem baixa citotoxicidade e poderem desempenhar, concomitantemente, as funções dos seus similares sintéticos (MONTERO *et al.*, 2007), e os OES, que são substâncias extraídas de plantas, sendo um misto de substâncias complexas lipofílicas, aromáticas e viscosas (TELES, 2003). Uma das características dos OES é a volatilidade. Além do mais, são sensíveis à luminosidade, motivo pelo qual devem ser armazenados em recipientes de cor âmbar ou azul-cobalto. A extração se dá por meio de vários processos. Dentre eles destaca-se o processo de destilação por arraste em vapor de água (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Estudos em todo o mundo vêm corroborando os efeitos satisfatórios de compostos isolados, extraídos de OES de plantas, que atuam como fungicidas naturais (ABDELGALEIL *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2008; KORDALI *et al.*, 2008). Os constituintes químicos desses óleos aromáticos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, óleos simples, fenóis, aldeídos, éteres, ácidos orgânicos, ésteres, cetonas, lactonas, cumarinas, até compostos contendo nitrogênio e enxofre. Podem ser utilizados para a síntese de vitaminas, antibióticos e antissépticos (SIMÕES *et al.*, 2004). A composição dos OES de uma planta é determinada pelo seu conjunto genômico, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007). Entretanto, fatores ambientais, tais como temperatura, umidade relativa, tempo de exposição ao sol, regime de ventos, grau de hidratação do terreno e presença de micronutrientes no solo podem influenciar na composição dos OES (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007).

O óleo essencial da *L. origanoides* tem sido estudado quanto às variações quantitativas nos teores de seus constituintes majoritários (STARHENKO *et al.*, 2010; VEGA-VELA & SÁNCHEZ, 2012). Betancur-Galvis *et al.* (2011) analisaram a composição química, a atividade antifúngica e citotóxica de nove óleos essenciais obtidos da *L. origanoides* coletadas em diferentes regiões da Colômbia, que foram classificadas em três quimiotipos, de acordo com a variação quantitativa nos teores dos constituintes majoritários, sendo eles: timol, carvacrol,  $\rho$ -cimeno/trans- $\beta$ -cariofileno, bem como a presença de compostos fixos (pinocembrina, naringenina, luteolina e quercetina) e dos voláteis (timol e carvacrol). Essas descobertas são indícios de que essa espécie possui potencial como antioxidante e antimicrobiano natural.

Em se tratando do OELO, testes *in vitro* têm sido feitos com diferentes microrganismos, cujos resultados têm sido promissores para a indústria farmacéutica (PRUDENTE & MOURA, 2013). Para os fungos, os OES podem afetar a barreira de proteção dos esporos ou agir antes da sua formação, resultando no desenvolvimento anormal e/ou rompendo os tubos germinativos (DANTYGNY & NANGUY, 2009). Muitos OES têm sido estudados e muitos deles têm chamado a atenção da indústria farmacéutica, contribuindo nas pesquisas de tratamento para doenças infecciosas (PRUDENTE & MOURA, 2013), além do setor de higiene, no desenvolvimento de desinfetantes e sanitizantes (BERALDO *et al.*, 2013; PEREIRA

*et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014). Na sua essência, os OES estão presentes nas plantas como mecanismos de defesa contra bactérias, fungos e insetos (BAKKALI *et al.*, 2008).

## **2.12 Microemulsões (MEs): estrutura e importância farmacológica**

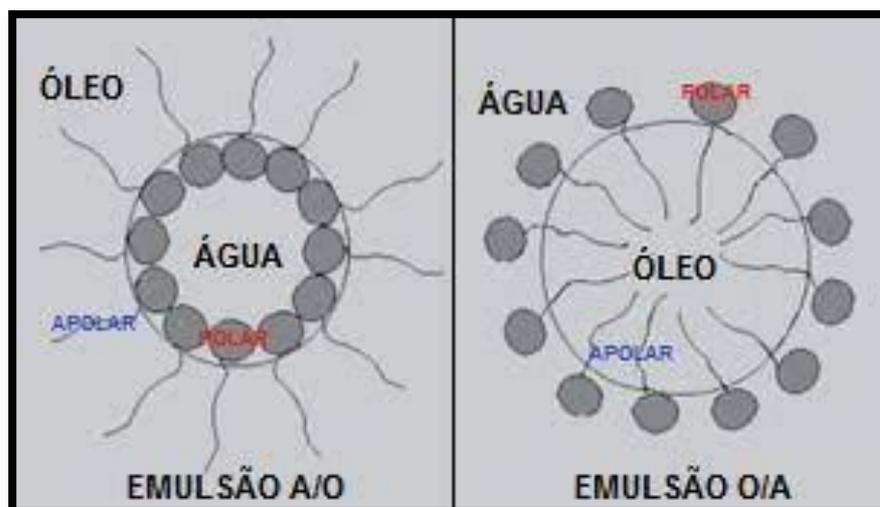
Os sistemas microemulsionados foram introduzidos na literatura por Hoar e Schulman (HOAR & SCHULMAN, 1943). No entanto, o termo microemulsão só passou a ser usado no final da década de 1950 por Schulman e colaboradores (SCHULMAN *et al.*, 1959).

Microemulsões (Figura 2) podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, que se formam a partir de uma aparente solubilização espontânea de dois líquidos imiscíveis, geralmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo e água (GUIMARÃES, 2013; FANUN, 2012; LI *et al.*, 2012; DAMASCENO *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2007; FORMARIZ *et al.*, 2005).

Por apresentar características singulares, como a facilidade de preparações e de esterilização por filtração, estabilidade termodinâmica, viscosidade adequada, transparência e a capacidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos, hidrofílicos e anfifílicos, a utilização de sistemas microemulsionados vem se tornando uma realidade (DAMASCENO *et al.*, 2011). Tais aspectos viabilizam uma melhor biodisponibilidade e diminuição da toxicidade dos fármacos, os quais, considerando sua composição, podem ser aplicados sem restrição, às vias de administração oral, ocular, parenteral, transdérmica, tópica, vaginal e retal (GUPTA & MOULIK, 2008).

Os sistemas microemulsionados podem ser distinguidos pela polaridade da fase dispersa, sendo do tipo óleo e água (O/A), quando as gotículas esféricas de óleo são envolvidas pelas moléculas de tensoativos em uma fase contínua de água, e do tipo água e óleo (A/O), quando a fase aquosa é a interna e o óleo sendo a fase contínua (DAMASCENO *et al.*, 2011).

**Figura 2 - Estrutura de microemulsões direta (O/A) e inversa (A/O)**



Fonte: Araújo (modificada) (2001)

Quando comparados às formas tradicionais de administração de fármacos, o sistema de liberação de fármaco (SLF) apresenta outras vantagens, a citar a não exposição do ativo ao metabolismo de primeira passagem e, também, não é invasivo (SUBEDI *et al.*, 2010).

A quantidade de produtos farmacêuticos utilizando a tecnologia de sistemas carreadores de fármacos, as MEs, têm aumentado significativamente e se mostram promissoras (VERMA & GASCO, 2001). O interesse no uso das MEs como sistemas liberadores de fármacos vem ganhando mais atenção por parte dos laboratórios industriais e dos pesquisadores acadêmicos. Consiste em uma alternativa farmacológica de baixo custo para o preparo, uma vez que não requer equipamentos específicos ou complexos, fato verificado ao longo do desenvolvimento desta pesquisa.

Partindo deste princípio e pelo fato de, até a presente data, não existir na literatura pesquisas envolvendo o desenvolvimento de ME com ativo de OELo com ação inibitória do fungo *C. albicans* em biofilme em superfície de resina própria para confecção de prótese dentária, esta pesquisa pretende adquirir um produto que seja eficiente neste propósito, além de ser de fácil uso, baixo custo, sustentável, com baixas ou nulas citotoxicidade e genotoxicidade.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Desenvolver microemulsão higienizadora para prótese dental removível, eficiente no combate à *C. albicans*, tendo como princípio ativo o OELo.

#### 3.2 Específicos

- Obter MEs que sejam eficientes contra contaminação por *C. albicans* em PDR;
- Caracterizar as MEs desenvolvidas, através de suas propriedades organolépticas e Físico-Químicas;
- Verificar em testes *in vitro* a eficiência de MEs com ativo de OELo frente ao fungo *C. albicans*, através do teste de disco-difusão;
- Investigar a eficiência das MEs como agente inibidor da formação de biofilme em PDR pela *C. albicans* em testes *in vitro*.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Características do oelo por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa (GC-EM)

A análise cromatográfica da composição química para quantificação e identificação dos compostos presentes no OELo foi realizada no Laboratório de Geoquímica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí - UFPI.

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação de misturas que se baseia na diferença de energia requerida para que cada componente da mistura passe da superfície líquida para uma fase gasosa. Análises de CG-EM foram realizadas no cromatógrafo GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da SHIMADZU, seguindo as seguintes condições de análise: injetor 250° C, e temperatura inicial do forno de 50° C, apresentando uma rampa de aquecimento 5° C/mim até 260°C permanecendo por 10 minutos, razão Split de 1:100, temperatura de interface 250°C e fonte de 250°C, faixa de massas de 50 a 400 Daltons, ionização por impactos de elétrons, 70 eV. Para cromatografia dos componentes foi

empregado uma coluna DB5-MS UI (Agilent), 30 cm x 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,25  $\mu\text{m}$  com fase estacionária de difenil dimetilpolissiloxano e Hélio como gás arraste.

A identificação foi realizada por comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas Nist08 e comparação com os registros de base da literatura (SILVA, 2012). A caracterização cromatográfica revelou os componentes do OELO, apresentados na Tabela 1.

## **4.2 Preparo dos sistemas microemulsionados**

Durante a fase de formulações, foram desenvolvidos quatro sistemas microemulsionados com diferentes concentrações do OELO a ser incorporado, adquirido na empresa Agropaulo Agroindustrial S/A, Fazenda Lagoa Vermelha, Rod. CE 123, Km 40 Jaguaruana – CE, Brasil. Foram também utilizadas as seguintes substâncias: tensoativo Labrosol®; co-tensoativo Plurol®; Miristato de Isopropila® (Synth, Brasil) e água purificada.

Os sistemas desenvolvidos foram denominados ME1, ME2, ME3 e ME4, cujos percentuais de OELO foram: 1%, 2%, 4% e 6%, respectivamente, além do controle negativo - CN - (ausência do OELO) e o controle positivo para os testes microbiológicos. A substância química de referência utilizada como controle positivo foi Anfotericina B®, antifúngico de amplo espectro, inibidor de membrana plasmática, alterando sua permeabilidade e provocando extravasamento dos componentes intracelulares em leveduras e fungos (KLEIN, 2007). Foram selecionadas cinco substâncias para compor as microemulsões: Labrosol (tensoativo); plurol (co-tensoativo); miristato de isopropila, água destilada e OELO, conforme mostra o quadro 2, a seguir.

**Quadro 2 - Substâncias usadas no preparo das Microemulsões**

Microemulsões	Substâncias
<b>ME1, ME2, ME3 e ME 4</b>	Labrosol® Plurol® Óleo essencial de <i>L. origanoides</i> ® Fase Oleosa (lipofílica) - Miristato de Isopropila® Fase Aquosa (hidrofílica) - Água desmineralizada®
<b>Controle Negativo</b>	Labrosol® Plurol® Fase Oleosa (lipofílica) - Miristato de Isopropila® Fase Aquosa (hidrofílica) - Água desmineralizada®
<b>Controle Positivo</b>	Anfotericina B® (128 µg/mL)

Fonte: Autoria própria (2022)

A preparação dos sistemas microemulsionados ocorreu no Laboratório de Dermofarmácia (LADERMO), Universidade Federal do Piauí – UFPI. Neste processo, para cada uma das quatro microemulsões foram selecionadas cinco substâncias, com variações em suas concentrações. Cada formulação teve seu preparo individual, iniciando-se com a pesagem das substâncias em balança analítica, aferindo a massa em gramas (g) de cada componente, realizando, na sequência, a homogeneização através de um agitador magnético múltiplo (SP LABOR®), em velocidades e tempos variados. As microemulsões apresentaram diferentes concentrações de *L. origanoides*, diferentes concentrações de miristato de isopropila, mantendo-se constantes as concentrações do tensoativo, co-tensoativo e água destilada, conforme Quadro 3, a seguir.

**Quadro 3 - Descrição da metodologia usada na preparação das microemulsões e dos controles.**

Microemulsões	Procedimento
ME1	Labrosol 40% + Plurol 10%, agitada a 500 rpm por 5min. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10min. Acrescentou-se 14% de Miristato de Isopropila, deixando ser agitado por 5min a 500 rpm. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm, por 10min. Acrescentou-se 1% de Óleo essencial da <i>L. origanoides</i> , seguindo os mesmos tempos e rpm citados anteriormente. Por fim, acrescentou-se 35% de água desmineralizada a 700 rpm, por 30min.
ME2	Labrosol 40% + Plurol 10%, agitada a 500 rpm por 5min. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10 min. Acrescentou-se 13% de Miristato de Isopropila, deixando ser agitado por 5 min a 500 rpm. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10 min. Acrescentou-se 2% de Óleo essencial de <i>L. origanoides</i> , seguindo os mesmos tempos e rpm citados anteriormente. Por fim, acrescentou-se 35% de água desmineralizada a 700 rpm, por 30 min.
ME3	Labrosol 40%+ Plurol 10%, agitada a 500 rpm por 5mi. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10min. Acrescentou-se 11% de Miristato de Isopropila, deixando ser agitado por 5min a 500 rpm. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10min. Acrescentou-se 4% do Óleo essencial de <i>L. origanoides</i> , seguindo os mesmos tempos e rpm citados anteriormente. Acrescentou-se 35% de água desmineralizada a 700 rpm, por 30min.
ME4	Labrosol 40% + Plurol 10%, agitada a 500 rpm por 5min. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10min. Acrescentou-se 6% de Miristato de Isopropila, deixando ser agitado por 5 min a 500 rpm. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10min. Acrescentou-se 6% de Óleo essencial de <i>L. origanoides</i> , seguindo os mesmos tempos e rpm citados anteriormente. Acrescentou-se 35% de água desmineralizada a 700 rpm, por 30min.
Controle Negativo	Labrosol 40% + Plurol 10%, agitada a 500 rpm por 5min. Após esse tempo acrescentou-se 15% Miristato de isopropila, deixando ser agitado por 5min a 500 rpm. Após esse tempo, elevou-se para 700 rpm por 10 min. Acrescentou-se 35% de água desmineralizada a 700 rpm por 30min.
Controle Positivo	Anfotericina-B® (128 µg/mL)

Fonte: Autoria própria (2022)

### **4.3 Caracterização das MES**

#### **4.3.1 Características Organolépticas**

A análise sensorial é importante para avaliar as características dos produtos, desde a escolha de cada matéria-prima, a realização da manipulação, até a finalização das formulações. Para isso, foram realizados diferentes testes com o propósito de prevenir resultados negativos no produto (TEIXEIRA, 2009). Apesar da simplicidade da avaliação das características organolépticas, problemas no aspecto visual e/ou na homogeneidade constituem indicadores seguros de problemas nas matérias-primas ou na preparação (OLIVEIRA, 2009). As características organolépticas analisadas para avaliar as microemulsões nesta pesquisa foram: cor (Amarelo – A; Amarelo-Claro – AC; Amarelo Médio – AM e Amarelo-Escuro – AE), aspecto: Homogêneo – HO e odor Característico – C; Sem Alteração – AS (SANTOS, 2015).

#### **4.3.2 Características Físico-Químicas**

A análise físico-química consiste em processos e técnicas que têm por finalidade determinar uma ou mais características de um produto, processo ou serviço, de acordo com um procedimento especificado (DJORDJEVIC *et al.*, 2014; HAYES *et al.*, 2013). Nesta pesquisa, as características físico-químicas das microemulsões analisadas foram: pH, densidade, potencial Zeta, tamanho das partículas e índice de polidispersão (IPD).

##### **4.3.2.1 Verificação de pH**

O pH das microemulsões foi determinado por potenciometria. Para isso, utilizou-se o pHmetro (Bel engineering, modelo w3B meter) pela determinação da diferença de potencial entre dois eletrodos, imersos na amostra a ser analisada. Antes de usá-lo foi feita limpeza do equipamento e calibração do eletrodo, utilizando-se soluções tampão de referência (pH 4 e 7). Para esta análise, feita em triplicata,

utilizou-se Beckers de 15 mL, contendo 10 g de cada formulação. A medição foi feita diretamente nas amostras, imergindo-se o eletrodo diretamente nas microemulsões (BRASIL, 2010).

#### **4.3.2.2 Densidade**

Para a análise da densidade, utilizou-se picnômetros de vidro com capacidade de 10 mL cada. Cada um dos picnômetros foram pesados vazios, cujos pesos em gramas (g) foram anotados. Em seguida encheu-se os picnômetros com água purificada cuidadosamente para evitar a formação de bolhas, pesando-os novamente. Em seguida, encheu-se os picnômetros com cada uma das amostras das microemulsões, pesando-os mais uma vez (BRASIL, 2003).

As densidades das microemulsões desenvolvidas, foram determinadas pela densidade relativa utilizando água destilada como padrão. O cálculo foi executado à temperatura de 25 °C, (FARMACOLOGIA BRASILEIRA, 2010; BRASIL, 2000). As densidades foram calculadas através da equação mostrada a seguir, onde  $d$  = densidade;  $m_0$  = massa do picnômetro vazio;  $m_1$  = massa do picnômetro com água destilada e  $m_2$  = massa do picnômetro com a amostra da microemulsão. A análise foi feita em triplicata.

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (1)$$

#### **4.3.2.3 Potencial Zeta e Tamanho das Partículas**

Potencial zeta é uma medida de magnitude eletrostática de repulsão ou atração de cargas entre partículas. Consiste em um parâmetro fundamental para indicar se a estabilidade da formulação é alta ou baixa. Esta medida fornece detalhes sobre as dispersões, como agregação ou floculação e pode ser aplicada para aumentar a estabilidade de dispersões, emulsões e suspensões. O potencial zeta demonstra o potencial elétrico de superfície das gotículas. Através de técnicas de eletroforese pode-se verificar este potencial, que é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante. Um alto potencial zeta garante boa estabilidade físico-química da dispersão coloidal (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Para análise do potencial zeta, foi utilizado um instrumento dinâmico de dispersão de luz, Zetasizer NanoZS90 (Malvern Panalytic cal), que apresenta um laser de He-Ne com comprimento de onda de 633 nm e opera com um ângulo de dispersão fixo em 90°. Antes da avaliação, as amostras, em triplicata, foram diluídas em água destilada, na proporção de 1:1000, a uma temperatura de 25°C.

A determinação do tamanho das partículas foi realizada com o objetivo de averiguar se as partículas apresentam dimensões micrométricas, visto que quanto menor o tamanho das partículas de uma ME, melhor a biodisponibilidade do fármaco em estudo. Segundo Reis (2014), o tamanho das partículas é considerado o parâmetro mais importante para a avaliação da estabilidade de um sistema disperso.

#### **4.3.2.4 Índice de Polidispersão (PDI)**

O PDI é um indicador de estabilidade e distribuição de tamanho das gotículas. Seu valor varia de 0,0 a 1,0. Quanto maior o PDI, menor a uniformidade entre tamanho de gotículas (PATEL *et al.*, 2013) e, inversamente, quanto mais próximo de zero, maior a homogeneidade de tamanho entre as gotículas (MOGHIMIPOUR *et al.*, 2013).

O índice de polidispersão das MEs foi determinado em equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Panalytic cal). As medidas foram realizadas em triplicata sob temperatura constante de 25 °C, com feixe de luz de comprimento de onda de 659 nm, com ângulo de incidência de 90°. As análises foram realizadas com as microemulsões diluídas em água destilada, na proporção de 1:1000.

O PDI revela a homogeneidade da população de gotículas, caracterizando uma distribuição monomodal ou polimodal. Nesta pesquisa, os valores de PDI foram altos, o que sugere uma distribuição de tamanho mais ampla ou polimodal (SOARES, 2012).

#### **4.4 Avaliação da atividade antifúngica**

No preparo do meio de cultura para verificação da viabilidade das cepas do fungo *C. albicans*, que estavam estocadas no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas de Microbiologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI, ATCC (American Type Culture Collection) 10231, utilizou-se 13 g de Ágar Sabouraud

Dextrose (ASD), para preparar 200 mL de meio, conforme instruções do fabricante. O Erlenmeyer contendo o ASD foi levado à autoclave, a uma temperatura de 121° C a 1 atm de pressão durante 45 min. Após esse tempo, regulou-se a autoclave para 60° C $\pm$  e esperou-se mais 15 min. Foram utilizadas 10 placas de Petri, previamente esterilizadas. Em cada uma das placas foram colocados 15 mL do meio de cultura para realização da semeadura de inóculos do fungo *C. albicans*, utilizando-se, para isso, uma alça microbiológica de platina flambada, através da técnica de esgotamento, para isolamento desta levedura. As placas de Petri foram incubadas em estufa por 48h, a 36° C $\pm$  (SILVA *et al.*, 2007). Todos esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas de Microbiologia da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

A cepa do fungo *C. albicans* de referência ATCC 10231, estava estocada em congelador no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da Universidade Federal do Piauí – UFPI. As cepas, após o período de incubação, se apresentaram confiáveis para realização dos testes, uma vez que se desenvolveram formando colônias.

Para realização dos testes, preparou-se dois meios de culturas: caldo BHI (Brain Heart Infusion) e Mueller-Hinton Agar. Preparou-se os dois meios de cultura para avaliar qual o mais relevante para a formação de colônias. No preparo destes meios de cultura seguiu-se as instruções do fabricante. Ao Mueller-Hinton Agar, acrescentou-se 2% de glicose. Ambos foram levados à autoclave por tempo suficiente para atingir a temperatura de 121° C. Após esse tempo, regulou-se a estufa em 60° C $\pm$ , por mais 15 min. O meio BHI foi distribuído em 06 tubos Falcon (10 mL em cada um) e o meio Mueller-Hinton Agar foi distribuído em 15 placas de Petri (9 x 15 mm). As placas de Petri foram inoculadas com o fungo *C. albicans* e guardadas em estufa a uma temperatura de 36° C  $\pm$ , por 48h (CLINICAL AND LABORATORY INSTITUTE, 2007).

#### 4.4.1 Antifungigrama Pelo Método de Disco-Difusão

O teste de disco-difusão (Protocolo M44-A) foi realizado em meios Mueller-Hinton Agar, suplementado com glicose a 2%, e BHI. O inóculo foi preparado usando-se colônias de aproximadamente 1mm de diâmetro, que foram suspensas em 15 mL de solução salina esterilizada e transferida para as placas de Petri e para os tubos Falcon através de alça bacteriológica. A turbidez da suspensão foi ajustada

para o padrão McFarland 0,5 aproximadamente de  $1$  a  $4 \times 10^8$  UFC/mL (Unidade Formadora de Colônias). Em 12 placas foram depositados quatro discos de papel, cada um deles embebido com uma das formulações testadas (em triplicata); duas placas com discos embebidos com o controle positivo (CP) e duas com discos embebidos com o controle negativo (CN). A seguir, as placas e os tubos inoculados foram levados à estufa bacteriológica, a  $37^\circ \text{C} \pm$ , por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata e comparados aos controles positivo (Anfotericina B®) e negativo (ausência do ativo). As placas foram lidas visualmente após um período de incubação citado, a  $35^\circ \text{C}$  e mensurados os halos formados em torno dos discos antifúngicos com uma régua, expressos em milímetros (DE VASCONCELOS *et al.*, 2011; ESPINEL, 2007).

#### 4.4.2 Corpos de Prova

As amostras de resina acrílica para base de próteses foram confeccionadas utilizando a resina autopolimerizável VIPI (VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Ao chegar na fase plástica da resina, ela foi pressionada por duas placas de vidro até chegar à espessura pretendida (2 mm) e foi demarcada com auxílio de um molde de vidro com o diâmetro de 4 mm. Após endurecimento total da resina, os corpos de prova obtidos passaram pela fase de acabamento e polimento com discos de abrasividade decrescente (Soflex Pop On – 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) montados em micromotor e contra ângulo odontológico, ficando com suas dimensões finais de 4 mm x 2 mm. Os corpos de prova ficaram submersos em água destilada à temperatura ambiente até a utilização e foram esterilizados em autoclave comum por 40 min, momento em que atingiu  $121^\circ \text{C}$ .

#### 4.4.3 Teste de formação de halo e inibição de biofilme

##### **4.4.3.1 Teste de Difusão em Ágar**

Os testes de disco-difusão em ágar foram feitos conforme descrito no documento M44-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) com a modificação de que o meio de cultura utilizado para determinação dos halos de crescimento foi o ágar ASD. 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de *C. albicans* preparada em

solução salina fisiológica (NaCl 0,85%) com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala McFarland ( $10^6$  células/mL) foi espalhada com uma alça de Drigaski descartável, na superfície do ágar ASD. Discos de papel estéreis embebidos com os sistemas microemulsionados foram colocados na superfície da placa após a inoculação. Os tratamentos consistiram nas microemulsões a base de *L. origanoides* a 1%, 2%, 4% e 6%. Como controle negativo foi utilizada uma formulação sem o ativo e como controle positivo, o antifúngico Anfotericina B ( $128 \mu\text{g/mL}$ ). As placas foram incubadas a  $37^\circ \text{C} \pm$  e, após 48 horas, o halo de inibição do crescimento foi medido com auxílio de uma régua milimetrada. A metodologia de disco-difusão foi realizada de acordo com as instruções do CLSI, adequando-se o meio ASD.

#### **4.4.3.2 Formação do Biofilme**

No teste da formação do biofilme, células leveduriformes foram semeadas em ASD (Difco Laboratories) a  $37^\circ \text{C} \pm$  por 18 horas para a obtenção das colônias. As cepas fúngicas foram inoculadas em tubos tipo Falcon contendo 4 mL em caldo (YPD), em seguida, incubadas em uma temperatura de  $37^\circ \text{C} \pm$  durante 18 horas para seu crescimento em caldo. Após este período, parte dessa suspensão foi colocada em outro tubo Falcon com meio YPG estéril para reajustar a concentração celular em  $10^6$  células/mL, de acordo com a densidade óptica (DO) de 2,0 na escala McFarland. Posteriormente, para avaliação da fase de adesão, 0,5 mL da suspensão celular padronizada foi transferida para placas de 24 poços onde estavam os corpos de prova no fundo de cada poço. A seguir, a placa foi incubada por duas (2) horas em uma temperatura de  $37^\circ \text{C} \pm$  para adesão inicial. Após esse período, uma alíquota de 0,5 mL do meio YPG foi adicionada em cada poço e 0,5 mL de cada um dos tratamentos (microemulsões de *L. origanoides* 1%, 2%, 4% e 6%, NaCl 0,85% e Anfotericina-B) nos poços correspondentes. Assim, o volume final do meio em cada poço foi de 1,5 mL. Em seguida, a placa de 24 poços foi incubada a  $37^\circ \text{C} \pm$  por 72 horas.

Após 72 horas de desenvolvimento do biofilme, os corpos de prova foram transferidos para uma nova placa de 24 poços contendo 0,5 mL de solução salina. O biofilme foi então removido para essa solução por pipetagem e a suspensão obtida transferida para eppendorfs estéreis. A partir dessa suspensão do biofilme,  $100 \mu\text{L}$  foram utilizados para fazer a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) e cada uma das diluições

plaqueadas em ágar ASD em triplicata, as quais foram incubadas por 48 horas a 37° C $\pm$  para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

#### **4.4.3.3 Determinação do Peso Seco do Biofilme**

Volumes de 200  $\mu$ l da suspensão de biofilme foram colocados em novos eppendorfs de 1,0 mL, previamente pesados e rotulados. Estes microtubos foram centrifugados (5 min, 10000 g), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada e deionizada. O precipitado foi dessecado por 24 horas. Após esse período, os microtubos foram pesados. O peso seco do precipitado foi calculado subtraindo o peso inicial dos microtubos (SALLI & OUWEHAND, 2015).

#### **4.5 Análise estatística**

Os pressupostos de igualdade de variância e distribuição normal de erros foram verificados para todas as variáveis de respostas testadas e os dados que não atenderam ao pressuposto foram transformados quando necessários (BOX *et al.*, 2005). Os dados de UFC originais foram transformados em logaritmos na base 10. O software Graphpad prism 9,02 program (Graphpad, La Jolla, Ca, USA) foi usado para análise estatística ANOVA seguida do teste de Tukey, utilizado para comparar as variáveis transformadas e o nível de significância foi de 5%.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Composição química do OELO**

O OELO foi analisado por Cromatografia gasosa, CG-EM. Pela análise da composição química, foram identificados 20 constituintes conforme apresentados na Tabela 1, a seguir. Os constituintes majoritários foram o Tymol com 44,65%, o p-Cymene 12,81% e o Carvacrol 11,30%. Comparados a outros estudos, ocorre uma diversidade de componentes majoritários que, segundo Gomes *et al* (2011), pode estar relacionado às condições genéticas, em função do local e das condições em que a planta foi cultivada.

**Tabela 1- Composição química do óleo essencial de *Lippia organoides***

Nº	RT	Similaridade	Constituinte	Fórmula Molecular	Área Absoluta	Área Relativa%
1	6.343	96	$\alpha$ -Thujene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1432992	1,85%
2	6.546	96	$\alpha$ -pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	581447	0,75%
3	8.002	94	b-Myrcene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1395490	1,81%
4	8.820	96	4-Carene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1635620	2,12%
5	9.047	96	o-Cymene	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	9903748	12,81%
6	9.182	95	D-Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	390244	0,50%
7	9.277	97	Eucalytol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	1014494	1,31%
8	10.034	97	1,4-Cyclohexadiene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	5794253	7,50%
9	12.541	96	2,7-Octadien-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	410523	0,53%
10	13.757	95	3-Cyclohexen-1-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	412562	0,53%
			Anisole, 2-isopropyl-5-methyl			
11	15.160	96		C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	1083393	1,40%
12	16.959	96	Thymol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	34516518	44,65%
13	17.189	95	Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	8734180	11,30%
14	19.445	96	Copaene	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	532545	0,69%
15	20.680	96	Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	7661926	9,91%
			1H-Cycloprop[e]azulene			
16	21.183	95		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	350837	0,45%
17	21.640	95	$\alpha$ -Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	356186	0,46%
			Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy			
18	22.125	84		C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	347635	0,45%
19	22.689	92	Gemacrene-B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	410563	0,53%
20	23.230	92	Naphthalene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	336457	0,44%

Fonte: Autoria Própria (2022)

Vega-Vela *et al* (2013) salientam que os níveis de diversidade genética em *L. organoides* são elevados. O composto majoritário pode variar gerando quimiotipos. Para populações de regiões diferentes da Colômbia, sete quimiotipos foram encontrados por Vega-Vela *et al* (2013). Estudos realizados por Costa *et al* (2011); Castro *et al* (2011); Andrade *et al* (2014) e Queiroz *et al* (2014) em OELO de plantas cultivadas na região Norte de Minas Gerais, apresentaram resultados diferentes quanto aos percentuais dos componentes majoritários, quando comparados com os desta pesquisa, sendo o Carvacrol com 32,70%; p-Cymene 23% e o Tymol com

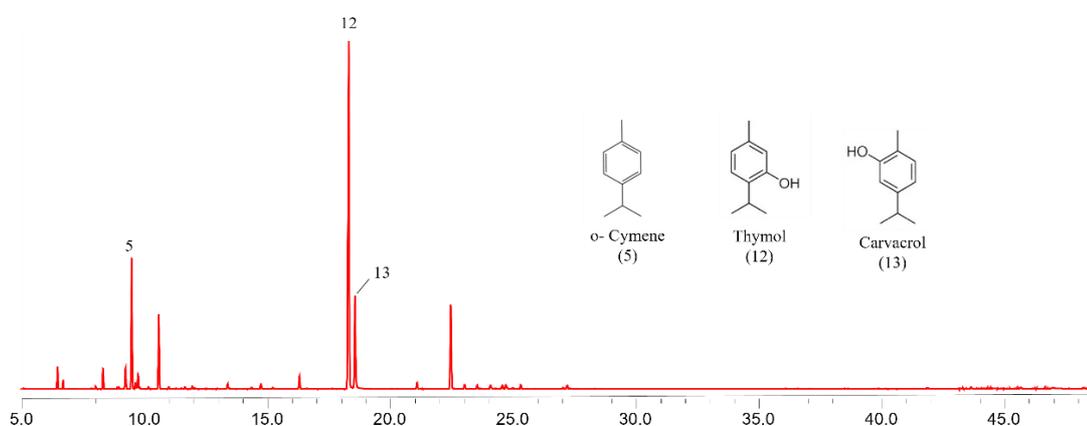
2,96%; corroborando, assim, com o que diz Gomes *et al* (2011) e Vega-vela (2013), citados acima.

## 5.2 Cromatograma do OELO

O índice de retenção dos componentes é obtido por interpolação, onde será relacionado o tempo de retenção do analito em estudo com o tempo de retenção de dois padrões, geralmente hidrocarbonetos, eluídos um antes e um após o pico do analito de interesse (INCZEDY *et al.*, 1998).

Utilizando-se a técnica de GC-MS foram identificados vários componentes citados na literatura (COSTA *et al.*, 2017; SIROCCHI *et al.*, 2017; LINDE *et al.*, 2016) como sendo componentes importantes contidos no OELO. Através da Figura 3 é possível observar o cromatograma, bem como os espectros de massas dos principais constituintes obtidos pela análise no GC-MS do OELO.

**Figura 3 - Cromatografia do óleo essencial de *L. origanoide* pela análise GC-MS**



Fonte: Autoria própria (2022)

## 5.3 Preparação dos sistemas microemulsionados

No preparo dos sistemas microemulsionados, verificou-se o quão é fundamental a atenção com a pesagem das substâncias, o tempo de agitação, bem como a adição da água destilada, que deve ser em um sistema gota-a-gota, na borda do copo de Becker, utilizando uma pipeta volumétrica. O tensoativo labrosol e o co-tensoativo plurol foram escolhidos por serem não-iônicos, considerada característica importante para utilização em formulações farmacêuticas, pois têm

baixa citotoxicidade às membranas celulares e elevada estabilidade química (GRAMPUROHIT *et al.*, 2011). Como o OELO é volátil e fotossensível, os cuidados voltados para essas duas propriedades foram bem relevantes, a fim de que, ao final, as microemulsões estivessem com as características organolépticas e físico-químicas desejadas, conforme citado anteriormente e exposto na Figura 4. Os componentes com seus percentuais estão expostos na Tabela 2 a seguir.

**Tabela 2 - Determinação das concentrações (%) dos componentes das formulações.**

Grupos Testes	Óleo essencial de <i>L. organóides</i> (%)	Miristato de isopropila (%)	Água destilada (%)	Tensoativo Labrosol (%)	Co-tensoativo Plurol (%)
ME1	1	14	35	40	10
ME2	2	13	35	40	10
ME3	4	11	35	40	10
ME4	6	9	35	40	10

Fonte: Autoria própria (2022)

#### 5.4 Características organolépticas e físico-química das MES

Quanto às propriedades organolépticas, as microemulsões apresentaram um aspecto transparente, considerando o amarelo, do fraco ao mais intenso, devido ao percentual de OELO presente, conforme Tabela 3, a seguir.

**Figura 4 - Aspecto visual das Microemulsões formuladas nesta pesquisa**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Tabela 3 - Propriedades organolépticas das amostras dos sistemas microemulsionados**

<b>Características organolépticas</b>	<b>Padrão</b>	<b>Microemulsão</b>				<b>Estabilidade (4 meses)</b>
<b>Cor</b>	A	AC	AM	AE	AI	SA
<b>Aspecto</b>	HO	HO	HO	HO	HO	SA
<b>Odor</b>	C	C	C	C	C	SA
<b>Sabor</b>	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA
A = Amarelo; AC = Amarelo-claro; AM = Amarelo médio; AE = Amarelo-escuro; AI = Amarelo intenso; HO = Homogêneo; C = Característico; NSA = Não se aplica; SA = Sem alteração.						

Fonte: Autoria própria (2022)

A cor amarela (A), padrão, mostra um espectro de variação, do Amarelo-claro (AC) ao Amarelo intenso (AI), os extremos, onde se encaixam as MES ME1 e ME4, respectivamente. As cores intermediárias, Amarelo-médio (AM) e Amarelo-escuro (AE), correspondem às MES ME2 e ME3. As diferenças de tonalidades de amarelo verificadas, se deve ao percentual de OELo. Em relação ao aspecto, todas as MES apresentaram-se homogêneas (HO), desde a formulação (janeiro/2022) até o dia 20/08/2022. O odor percebido é o de menta, característico (C) da essência testada, OELo. A característica sabor não se aplica (NSA) a este tipo de formulação.

Os valores de pH verificados nas MEs estão dentro do desejado. Os valores padrão estão entre 4 e 7. A densidade representa importante indicador de estabilidade de microemulsões. A presença de ar, por exemplo, pode alterar a cor (BEZERRA, 2001). Os resultados da verificação de pH e da densidade das MEs formuladas nesta pesquisa, expostos na Tabela 4, indicam que elas estão de acordo com o esperado para um sistema microemulsionado.

**Tabela 4 - Valores de pH e de densidade dos sistemas microemulsionados**

<b>Microemulsões</b>	<b>pH</b>	<b>Densidade (g/m)</b>
<b>ME1</b>	6,06	1,05
<b>ME2</b>	6,56	1,14
<b>ME3</b>	6,27	1,15
<b>ME4</b>	6,73	1,10

Fonte: Autoria própria (2022)

Os resultados das análises de dimensões de partículas, potencial zeta e IPD, revelam valores adequados das MEs 1, 2 e 3, com destaque para a formulação a 6% em termos de tamanho de partículas. Esta, apresentou valor de tamanho de gotículas e PDI fora dos padrões para uma microemulsão, mesmo assim, se mostrou eficaz no combate ao fungo *C. albicans*. Em vista de tais dados, pôde-se concluir que todas as MEs, exceto a 4, com 6% de OELO, apresentaram adequabilidade para o uso como veículo do OELO.

O tamanho médio de gotículas nas formulações, mesmo não sendo tão pequenas, foi compatível com o tamanho de microemulsões. O tamanho desejado para uma ME é de 100 nm, entretanto, alguns pesquisadores (SHAH *et al.*, 2010; 2013; NEMICHAND & LAXMAN, 2016; OKUR *et al.*, 2016) classificam ainda como ME sistemas em que as gotículas apresentam tamanho de até 200 nm.

A Tabela 5, a seguir, mostra as dimensões das partículas e o potencial zeta das MEs produzidas nesta pesquisa, denominadas ME1, ME2, ME3 e ME4, tendo como princípio ativo o OELO. O diâmetro das partículas das MEs variou entre 150,8 nm e 465,4 nm. Este resultado revela que a formulação 4, com 6% de OE de *L. organoides*, está fora do padrão. Este resultado pode ser interpretado pela alta quantidade do OE. O potencial zeta verificado variou entre -33,2mV e -42,6mV. Este resultado corrobora com o que diz a literatura: quando são encontrados valores baixos de potencial zeta, entende-se que as forças atrativas predominam, favorecendo a estabilidade do sistema (AULTON, 2005; FRANGE & GARCIA, 2009; SINKO, 2008). Kong & Park (2011) afirmaram que os valores de potencial zeta devem estar entre -30mV e +30mV, ou seja, as MEs formuladas nesta pesquisa descrevem dispersão estável. Sinal positivo ou negativo está relacionado com a carga positiva ou negativa das partículas do óleo ou tensoativo presentes na interface do sistema (BEDIN, 2011; BARROS, 2013). Nesta pesquisa, todas as MEs obtiveram valores negativos para o potencial zeta. Os valores referentes ao tamanho das gotículas e o índice de polidispersão (IDP) se mostraram relevantes, exceto para a ME a 6%, que está fora do padrão. Para análise do tamanho da gotícula e o índice de polidispersão foram utilizados como parâmetros de medida os índices de refração do meio dispersante, água (IR=1,33) (GALVÃO, 2015).

**Tabela 5 - Valores das dimensões de partículas, potencial zeta, índice de polidispersão (PDI) das microemulsões com óleo essencial de *L. origanoides***

Microemulsões	Diâmetro (nm)	Potencial zeta (mV)	Tamanho de gotículas (nm)	PDI
ME1	150,8	-40,5	150,8	0,215
ME2	176,8	-33,2	176,8	0,236
ME3	164,2	-38,6	164,2	0,292
ME4	465,4	-42,6	465,4	0,534

Fonte: Autoria própria (2022)

### 5.5 Avaliação da atividade antifúngica

Dos meios de cultura do fungo *C. albicans* usados para avaliar a eficácia do OELO, o Sabouraud (ASD) e o Mueller Hinton Agar mostraram produção significativa de esporos sendo, portanto, adequados para o preparo dos inóculos, conforme mostra a Figura 5. Os halos de inibição no meio ASD se revelaram mais nítidos e maiores quando comparados com os halos formados no meio Mueller Hinton Agar, apresentados na Figura 6.

Na avaliação antifúngica, as MEs contendo o OELO cujas concentrações foram de 1%, 2%, 4% e 6%, observou-se a sensibilidade através da formação de halos de inibição de crescimento de cepas do fungo *C. albicans*. Comparou-se os halos formados nas MEs, com o halo da formulação contendo o fungicida Anfotericina-B, como padrão (CP). Diante dos resultados mostrados na Tabela 6, pôde-se verificar a eficiência do OELO. De acordo com os resultados obtidos, constata-se que a *C. albicans* revelou-se sensível à ação do OELO em todas as concentrações, com uma pequena variação entre elas. Convém ressaltar que as MEs a 2% e 4% mostraram diferenças significativas frente ao CP e que a com 6% de OELO, mesmo tendo revelado resultado satisfatória frente ao fungo *C. albicans*, não é considerada uma ME, devido o diâmetro de suas gotículas estarem fora do padrão, conforme mostra a Tabela 5. As MEs são sistemas transportadores de fármacos relevantes, pois compartimentalizam o ativo e os direcionam para os sítios onde deverão exercer o efeito farmacológico (OLIVEIRA *et al.*, 1992; HARWOOD ACADEMIC, 1998).

O potencial antifúngico da espécie *L. origanoides* tem sido apresentado em estudos através de metodologias diversas. Farias *et al.* (2012) testaram extratos etanólicos da planta através de difusão em disco, verificando sua efetividade contra 45 estirpes de espécies de *Candida*. Batista *et al.* (2013), utilizando o método de difusão em Agar verificaram que tanto o óleo quanto o extrato da planta exibiram efeito contra linhagens de *C. albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

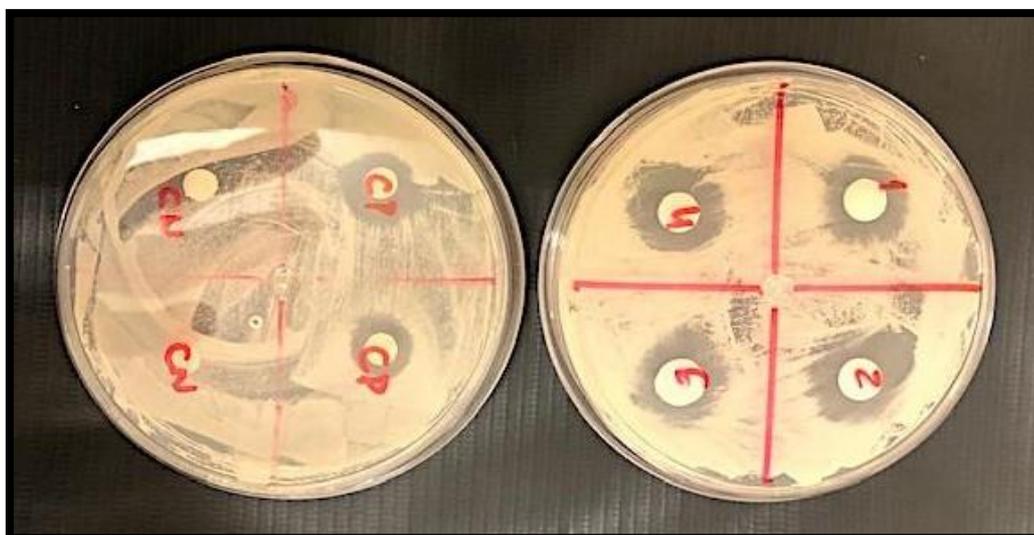
Segundo Fontenelle *et al.* (2007), estudo com o OELO apresentou potencial inibitório significativo frente à *Candida*, exibindo halos de inibição de crescimento variando de  $9,8 + 0,9$  a  $23,3 + 1,8$  mm, sendo o constituinte majoritário o Tymol. De acordo com estudo realizado por Botelho *et al.* (2007), as zonas de inibição para *C. albicans* foram 10,6 e 9 mm. Os mesmos autores observaram que os constituintes majoritários do OELO, em seu estudo, eram o Tymol e o Carvacrol, respectivamente. Diante do exposto, pode-se observar que os óleos essenciais de *L. origanoides* que apresentam maiores teores de Tymol tiveram o mais expressivo potencial inibitório frente à *C. albicans*.

**Figura 5 - Placa de Petri contendo colônias do fungo *C. albicans* ATCC 10231 em meio de cultura ASD**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Figura 6 - Halos de inibição formados ao redor de discos impregnados com as MEs, CN e CP**



Fonte: Autoria própria (2022)

Legenda - CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; 1, 2,3 e 4 percentuais de óleo essencial de *L. origanóides* a 1%, 2%, 4% e 6%, respectivamente.

**Tabela 6 - Valores em tamanho dos halos de inibição para avaliação da atividade antifúngica de microemulsões contendo óleo essencial de *L. origanóides*.**

Microemulsão	Óleo essencial de <i>L. origanóides</i> (%)	Halo (mm)
ME1	1	17,0
ME2	2	18,0
ME3	4	17,3
ME4	6	18,3
CN (Sem o ativo)	-	0,0
CP (Anfotericina B)	-	13,0

Fonte: Autoria própria (2022)

## 5.6 Tratamento do biofilme com os sistemas microemulsionados

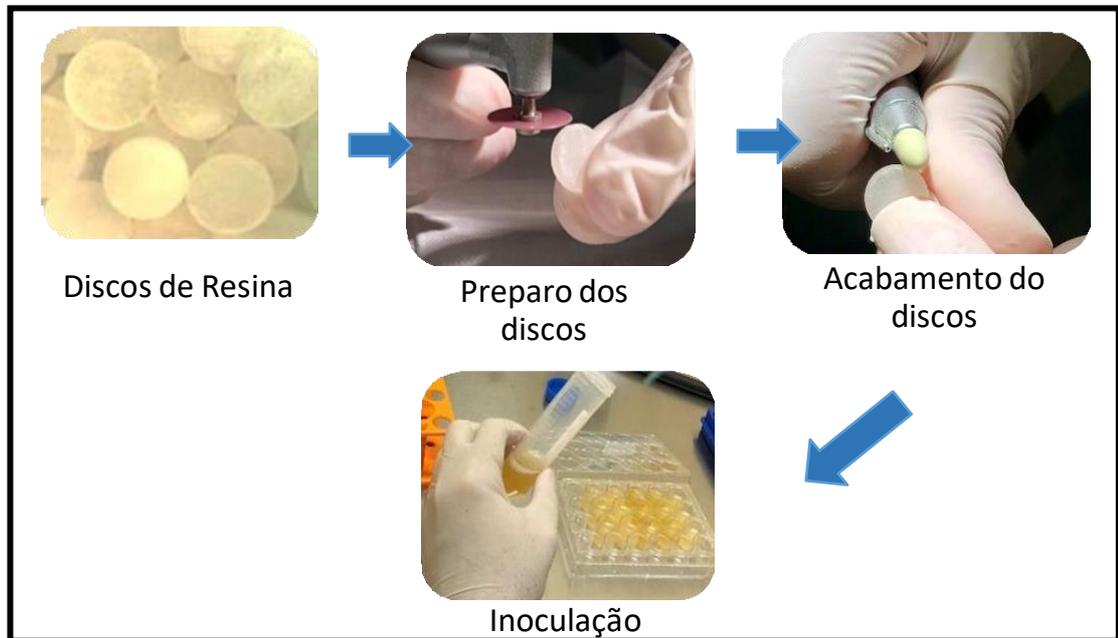
A cavidade oral é um ambiente que favorece à presença e multiplicação de microrganismos oportunistas, que são mantidos sob controle do sistema imunológico (ZAGO *et al.*, 2015). Esses microrganismos formam biofilme como estratégia de

sobrevivência, podendo tanto se desenvolver em superfícies bióticas quanto abióticas (CHANDRA *et al.*, 2001; AZEREDO *et al.*, 2012). A presença desses biofilmes associada à precária higienização oral pode otimizar o desenvolvimento de diversas patologias (AZEVEDO & SUTHERLAND, 2008), como por exemplo a estomatite protética (BADARÓ *et al.*, 2017).

A prática diária de métodos de higienização mecânica deve ser associada a outros agentes higienizadores. Nesta pesquisa, defende-se a utilização de um produto natural e eficiente no combate e controle de microrganismo formador de biofilme protético, ajudando na redução do risco de infecções recorrentes e persistentes, principalmente em pacientes idosos devido a fatores diversos, a citar a baixa imunidade, ocasionada, muitas vezes, pelo baixo nível nutricional, o que repercute na saúde geral do indivíduo.

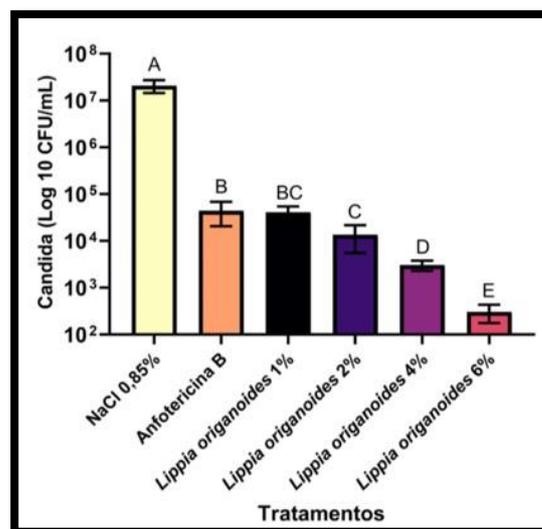
Neste sentido, as MEs produzidas nesta pesquisa foram testadas em corpos de prova padronizados (Figura 7), conforme já descrito, cujo biofilme foi induzido *in vitro*, utilizando-se, para isso, cepas de produção recente de *C. albicans* ATCC 10231. A fim de garantir confiabilidade, os procedimentos foram realizados em triplicatas, de modo seriado. Conforme os dados expostos no Gráfico 1 a seguir, pôde-se concluir que o tratamento do biofilme formado nos corpos de prova foi positivo quanto a inibição deste fator de virulência.

**Figura 7 - Preparação dos corpos de prova e indução do biofilme**



Fonte: Autoria própria (2022)

**Gráfico 1 - Avaliação da inibição do biofilme induzido pelas microemulsões em diferentes concentrações do óleo de *L. origanoides***



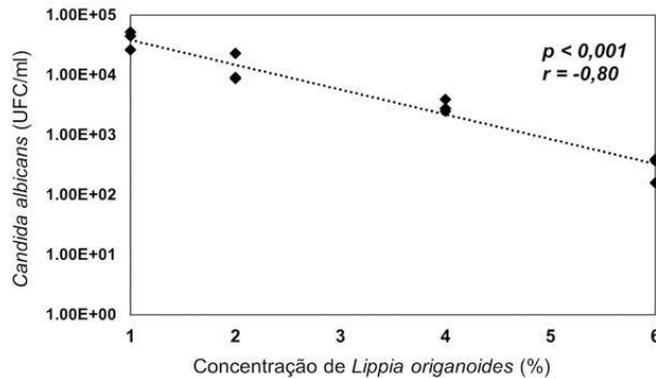
Fonte: Autoria própria (2022)

Legenda: Média ( $\pm$  DP) do halo de inibição formado de acordo com os tratamentos. Letras diferentes indicam diferença estatística.

### 5.6.1 Peso Seco do Biofilme

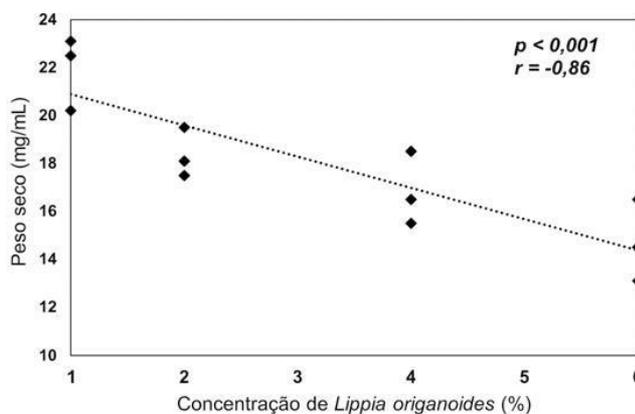
Os valores do peso seco do biofilme da cepa de *C. albicans* ATCC 10231 após 72 horas de formação estão demonstrados nos Gráficos 2 e 3. O tratamento com as MEs durante a formação da película do biofilme promoveu redução estatisticamente significativa no peso seco do biofilme. Percebe-se no gráfico as duas correlações (correlação de Pearson): a correlação de UFC/mL com a concentração de óleo essencial de *L. origanoides* e correlação do peso seco com a concentração do óleo essencial de *L. origanoides*. As duas correlações foram fortes e inversamente proporcionais ao aumento da concentração de *Lippia*, ou seja, quanto maior a concentração de *Lippia* menos a contagem de UFCs no biofilme e menor o peso seco.

**Gráfico 2 - Correlação UFC x concentração de óleo essencial de *L. origanoides* (%)**



Fonte: Autoria própria, (2022)

**Gráfico 3 - Correlação peso seco x concentração de óleo essencial de *L.origanoides* (%)**



Fonte: Autoria própria, (2022)

Quanto aos resultados da atividade *Anti-Candida*, vale ressaltar que, em comparação com o CP (Anfotericina-B), o crescimento fúngico em presença das MEs foi pequeno, sendo, tal fato, atribuído ao bioativo. A atividade antimicrobiana do OELO já é comprovada e os dados aqui encontrados corroboram com a literatura. Estudos realizados na região Norte de Minas Gerais relataram atividade antimicrobiana efetiva (ANDRADE *et al.*, 2014). A presença de compostos como o Tymol, Carvacrol,  $\gamma$ -terpineno e p-cymene confere atividade antimicrobiana ao OELO, conforme relatado por vários autores citados por Oliveira *et al* (2014). Andrade *et al* (2014) citaram nos resultados de seus estudos que possivelmente a combinação p-cymene, em alta concentração, juntamente com o Tymol e carvacrol possam contribuir com a ação antimicrobiana do OELO. Guimarães *et al* (2014) concluíram que a atividade antimicrobiana do OELO foi superior à ação do composto carvacrol isoladamente, indicando que a ação conjunta dos componentes do óleo possam potencializar a atividade antimicrobiano.

## 6 CONCLUSÃO

Esta pesquisa consistiu no desenvolvimento de MEs, suas caracterizações organolépticas e físico-químicas e realização de testes. Foram realizados testes com discos impregnados com os antifúngicos à base de OELO, contendo concentrações diferentes, sobre os meios de cultura em placas de Petri, colonizadas pelo fungo *C.*

*albicans*, ATCC 10231, e em corpos de prova feitos com resina para base de PDR com biofilme induzido, com a mesma espécie de fungo.

Diante dos resultados apresentados neste trabalho de pesquisa, percebeu-se que todas as MEs formuladas e testadas sobre o fungo *C. albicans* apresentaram resultados satisfatórios, salientando as de concentrações 2% e 4%, como as mais indicadas para higienização de PDR. Aqui, não se faz menção à formulação com 6% de OELO, visto não ser uma ME, descaracterizada como tal pelo tamanho das gotículas, que se apresentaram fora do padrão. Assim, pôde-se inferir que:

- Os testes físico-químicos com os sistemas microemulsionados, demonstraram que as MEs podem constituir alternativas para uso em tratamentos alopáticos sintéticos, embora necessite de estudos complementares no que se refere ao seu efeito sobre as PDR e também estudos envolvendo um número maior de espécies de *Candida*.
- Mediante análise dos halos formados ao redor dos discos impregnados com as MEs e também através da verificação das correlações peso seco e concentração de OE de *L. origanoides* e a correlação UFC e concentração do OE de *L. origanoides*, todas as concentrações estudadas foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* ATCC 10231.
- Os resultados obtidos demonstram que o OELO apresenta potencial para ser utilizado na elaboração de fármacos antissépticos. Para tanto, serão necessários estudos mais aprofundados, no que se refere ao percentual de OELO e também em testes *in vivo*.

Como perspectivas futuras, pretende-se desenvolver uma pesquisa mais intensa quanto ao percentual de OELO e à caracterização físico-química, no que se refere ao tamanho das gotículas, bem como estender os testes das MEs frente às mais variadas espécies de *Candida* que habitam a cavidade oral.

## REFERÊNCIAS

- ABDELGALEIL, S. A. M. *et al.* **Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemia Judaica* L.** *Bioresource Technology*. v. 99, p. 5947-5950, 2008.
- ABELSON, D. C. **Denture plaque and denture cleansers: review of the literature.** *Gerodontology*. ct; 1(5):202-6, 1985.
- ALAVARCE, R. A. *et al.* **The Beneficial Effect of *Equisentum giganteum* L. against *Candida* biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis.** *Edid Based Complement Alternat. Med*, 2015.
- ALENCAR, *et al.* **Envelhecimento do aparelho digestório.** In: *Geriatrics. Fundamentos Clínicos e Terapêuticos*. São Paulo: Atheneu, 1994.
- ALVARES, C. A. *et al.* **Candidiase Vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras.** *J Bras Patol Med Lab*, 2007.
- ANDRADE, E. D. **Protocolos indicados na Prática Odontológica.** In: *Terapêutica medicamentosa em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 1999.
- ANDRADE *et al.* **Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officiale*: composição, atividade antioxidante e antibacteriana.** *Rev Ciênc Agron*; 43(2):399-408, 2012.
- ANDRADE, V. A. *et al.* **Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia organoides*.** *Pesq. Vit. Bras.* 34(12):1153-1161, 2014.
- ANIBAL, P. C. *et al.* **Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp.** *Braz J Microbial*, 2013.
- Arruda, F. J. S. *et al.* **Cirurgião- dentista e técnico em prótese dentária: uma relação de mutualismo obrigatório.** *Journal of Multidisciplinary Dentistry*, 10(1), p.65-9. <https://doi.org/10.46875/jmd.v10>, 2020.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed.
- AUSTREGÉSILO, S. C. *et al.* **Acessibilidade a serviços de saúde bucal por pessoas idosas: uma revisão integrativa.** *Rev. Bras. Geriatr Gerontol*, v.18, n.1, p.189-99, 2015.
- AZEREDO, C. S. *et al.* **Proposta de padronização de método laboratorial para obtenção de dentina afetada por cárie.** *Dissertação (Mestrado em Odontologia)*. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2012.

AZEVEDO, J. & SUTHERLAND, I. W. **The use of phages for the Removal of infectious biofilms.** Curr. Pharm. Biotechnol, p.261-266, 2008.

BADARÓ, M.M. *et al.* **Clinical trial for evaluation of *Ricinus communis* and sodium hypochlorite as denture cleanser.** J Appl Oral Sci, 324-333, 2017.

BAKKALI, F. *et al.* **Biological effects of essential oils - A review,** v.2, p.446-475, 2008).

BARBEAU *et al.* **Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture - related stomatitis.** Oral Surg Oral Med Pathol oral Radiol, p.51-9, 2003.

BARRETO *et al.* **Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.** European Journal of Integrative Medicine, Germany, p. 1-16, 2014.

BARROS, A. R. N. **Desenvolvimento, Caracterização e Atividade Antifúngica de Microemulsões O/A contendo Anfotericina B.** Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

BATISTA, R. S. A. *et al.* **Atividade antifúngica de alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida spp.*** Revista Agropecuária Técnica, v. 34, p. 40-49, 2013.

BATISTA, J. B *et al.* **Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética.** Rev Odontol Univ - São Paulo. v.13, n.4, p.348-8, 1999.

BEDIN, A. C. **Nanoemulsões contendo Benzoilmetronidazol: Desenvolvimento, Caracterização e Estudo de Liberação *in vitro*.** Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

BERALDO *et al.* **Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos.** Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v.43, n.4, p. 463-440, 2013.

BETANCURT-GALVES *et al.* **Actividad antifúngica, citotóxica y composición química de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K recolectadas em Colômbia.** Salud UIS, v. 43, n.2, p.141-148, 2011.

BIANCHI, C. M *et al.* **Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses.** Rev Inst Med Trop. p. 58-17, 2016.

BORAKS, S. **Distúrbios bucais na Terceira idade.** In: BRUNETTI, R.; MONTENEGRO, F. L. P. Odontogeriatrics: noções de interesse clínico. São Paulo: Artes Médicas, cap. 6. p.87-97, 2002.

BORBA, A. N. & MACEDO, M. **Plantas medicinais usadas em saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil.** Acta. Boct. Bras, p. 771-782, 2006

BOTELHO, M. A. *et al.* **Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 40, p. 349-356, 2007.

BOX, *et al.* **Statistics for Experimenters: Desing, Inovation, and Discovery.** 2. ed. New York, John Wiley & Sons, 2005.

BRAGA, P. C. *et al.* **Thymol Inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm.** Int J Antimicrob Agents, p.472-7, 2008.

BRAGA, S. R. S. *et al.* **Avaliação das condições e satisfação com as próteses em idosos da região central do estado de São Paulo (Brasil).** Rev. Odontol. Unesp., São Paulo, v.31, n.1, p. 39-48, 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, Brasília, Editora Anvisa, 2. ed, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO - RE nº 899, de 29 de maio de 2003-**Guia para avaliação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Brasília: ANVISA, 2003.

BRASIL, 2009. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília - DF, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira.** 5e.d. Brasília: ANVISA, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. SB - Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados principais [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2011 [citado 2014 Jan. 9]. Disponível em>  
[http://dab.saude.gov.br/cnsb/sbbrasil/arquivo/projeto\\_sb2010\\_relatorio\\_final.pdf](http://dab.saude.gov.br/cnsb/sbbrasil/arquivo/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf).

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais, 2009. **MS Elaboração Relação de Plantas medicinais de Interesse ao SUS.** Retrived January5, 2022, from  
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>.

BUDTZ-JORGENSEN, E. **Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections.** Ata Odontol Scand, p. 61-9, 1990.

BUDTZ-JORGENSEN, E. **Material, and method for cleaning dentures.** J Prosthet Dent. 42(6): 619-23, 1979.

BURT, S. **Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - a review**. International Journal of food Microbiology. v.94, p.223-253, 2004.

CAMPAGNOLE *et al.* **Candidiose, qual o melhor tratamento?** JBC. Bras. clin. odontol. linteg. p. 72-6, 2004.

CAMPBELL, C. H. C. T. **Alterações da microflora bucal em pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo**. Ortodon Gaúcha, p.98-109, 2003.

CARDOSO, M. *et al.* **Edentulismo no Brasil: tendências, projeções e expectativas até 2040**. Ciências & Saúde Coletiva, 2016.

CARLO, H. *et al.* (2015). Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review, Evidence-based complementary and alternative medicine. *Hindawi Publishing Corporation*. [Em linha]. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/147804>>. [Consultado em 27/04/2016].

CASTRO, C. E. *et al.* **Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Paulínia, v.13, n.3, p.293-297, 2011.

CASTRO *et al.* **Antimicrobial activity of *Lippia origanoides* Cham, (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. Revta Bras. Plantas medic, p.293-297, 2012.

CAVALCANTI, S. C. H. *et al.* **Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch)**. 2010. Bioresource Technology, India, v. 101, n. 2, p. 829-832, 2010. Disponível em: [http://ac.els-cdn.com/S0960852409010876/1-s2-S0960852409010876-main.pdf?\\_tid=16db57c0-c7cb-11e3-b223-0000aacb35d&acdnat=1397916262\\_e2f17c1ed2a6eb0c31bff0e2f5eb02](http://ac.els-cdn.com/S0960852409010876/1-s2-S0960852409010876-main.pdf?_tid=16db57c0-c7cb-11e3-b223-0000aacb35d&acdnat=1397916262_e2f17c1ed2a6eb0c31bff0e2f5eb02). Acesso em: 19 julho 2022.

CHANDRA *et al.* **Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro**. J Dent Res. 2001, p. 903-8.

CHALMERS, J. M. & ETTINGER, R. L. **Public health issues in Geriatric dentistry in the United States**. Dent Clin North, p. 423-446, 2008.

CHANGE, H. Y. T *et al.* **Antifungal activity of essential oil and constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf Against plant pathogenic fungi**. Bioresource Technology. v. 99, p. 6266-6270, 2008.

CHAU, V. B. *et al.* **In depth disinfection of acrylic resins**. J Prosthet Dent, p. 309-13, 1995.

CHEN, X. *et al.* **As propriedades anticâncer da *Salvia miltiorrhiza***. Bunge (Dhen): uma revisão sistemática. Med Res Ver, p. 768-94, 2014.

CLINICAL and laboratory Standards Institute (CLSI). **Method for Antifungal Disk diffusion Suscetibility Testing of Yeasts**. Second edition. M44-A2. 2nd. ed. Pa, USA, 2007.

COSTA, S. M. O. *et al.* **Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae**. Revista Brasileira de Farmacognosia, p.66-67, 2017.

COSTA *et al.* **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e o extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite**. Biotemas, p. 1-6, 2011.

COSTA, P. S. *et al.* **Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae)**. Hoehnea, p.158-171, 2002.

COUNCIL ON DENTAL MATERIALS, INSTRUMENTS AND EQUIPAMENT-Denture cleansers. J Am Dent Assoc,77-9, 1983.

CUNHA, V. P. P. & MARCHINI, L. **Prótese total contemporânea na reabilitação bucal**. São Paulo: Santos, 2007.

DAJANI, A. S. *et al.* **Prevention of bacterial endocarditis: Recommendations by the American Heart Association**. Journal of the American Dental Association. n. 128, p.142-1151, 1999.

DAMASCENO, B. P. E. L. *et al.* **Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis**. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 32, n.1, p. 9-18, 2011.

DANTIGNY, P. & MANGUY, S. P. M. **Significance of the physiological state of fungal spores**. International Journal of Food Microbiology, p.16-20, 2009

DA SILVA *et al.* **Effects of nistatin, fluconazole and propolis on poly (methyl metacrylate) resin surface**. Braz Dent J. 19(3):90-6, 2008.

DA SILVA *et al.* **Prevalência de espécies de *Candida* spp. Isoladas da cavidade oral e próteses dentárias removíveis de pacientes atendidos em Clínica Odontológica**. Colloq Vitae, 10(1), 52-57, 2018,

DAVENPORT, J. C. **The oral distribution of candida in denture stomatitis**. Br Dent J, P.152-6, 18/Aug. 1970.

DAVIN, R. B. M. *et al.* **Estudo com idosos de instituições asilares no município de Natal/RN: características socioeconômicas e de saúde**. Rev Latino-am Enferm. p.518-24, maio/jun, 2004.

DE VASCONCELOS, A. A. *et al.* **Chromogenic médium for direct susceptibility testing of *Candida* spp. isolated from urine**. Mycopathologia, p. 125-30, Aug.m2011.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais da saúde precisam saber.** São Paulo: UNESP, 2007.

DITTERICH, R. G. *et al.* **"in vitro" antimicrobial of natural substances in tooth-pasts.** *Odontologia. Clin Cientif.* v.6, n.4, p.303-307, 2007.

DJORDJEVI *et al.* **Characterization of caprylocapryl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.271, p.11-19, 2014.

DOLAN *et al.* **Acess to dental care among older adults in the United States.** *Dent Educ.* p.196 - 74, 2005.

DONLAN, R. M. **Biofilmes acompanhados a dispositivos.** *Emerg Infect Dis* (2001) p.277- 81. doi:10.3201/eid0702.010226.

DOUGLAS, L. J. **Biofilmes de *Candida* e seu papel na infecção.** *Trends Microbiol* (2003) 11:30-6. doi:10.1016/50966-842X (02)0000-1

DUARTE, M. C. T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil.** *Revista Multiciência*, n.7, 2006.

ELLIASSON, L. *et al.* **The predominant microflora of the palatal mucosa in an elderly island population.** *Acta Odont Scand.* p.163 -169, 1992.

ENDO, E. H. *et al.* **Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*.** *Rev Microbial*, p.534-4, 2010.

ERNEST, C.; ANGST, J. **Expression in old age. Is There a real decrease in prevalence? A review.** *Rev Arch Psychiatry Clin Neurosci*, p.272-87, 1995.

ESPINEL - INGROFF, A. **Standardized Disk Diffusion Method Yeasts.** *Clinical Microbiology NewsLetter*, 2007.

FANUN, M. **Microemulsions as delivery systems.** *Current Opinion in Colloid interface Science*, v. 17, p.306-313, 2012.

FARMACOLOGIA Brasileira, 5.ed. Brasília: ANVISA. V.2, 2010.

FARIAS, E. M. F. G. *et al.* **Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species.** *Journal of Herbal Medicine*, v. 2, p. 63-67, 2012.

FERNANDES, L. P. *et al.* **Spray dring microencapsulation on of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends.** *Food and bioproducts processing*, p.425-432, 2012. Disponível em <http://www.sciencedirect.com> Acesso em 05/08/2022.

FIGUEIREDO, A. C. *et al.* **Plantas aromáticas e medicinais - óleos essenciais e voláteis.** *Revista da APH.* v.114, p.108-114, 2014.

FONSECA, P. *et al.* Higiene de próteses removíveis. **Rev. Port. Estomatal. Cir. Maxiloface**, p.141-146, 2007.

FONTENELLE, R. O. S. *et al.* **Chemical composition, toxicological aspects, and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 59, p.934-940, 2007.

FORMARIZ, T. P. *et al.* **Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 41, p.301-313, 2005.

FRANCISCO, K. S. F. **Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico** Revista - Saúde v.4, n.1, p.18-24, 2010.

FRANGE, R. C. C. & GARCIA, M. T. J. **Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 30, p.263-271, 2009.

FUENTEFRIA, A. M. *et al.* **Incidence of *Candida* spp. in oral cavity of elderly with removable, total or partial, dental prosthesis in the city of Coronel Freitas, State of Santa Catarina, Brazil.** Rev. Panam.Infectol. São Paulo, v.12, n.12, p.17-22, 2010.

GALVÃO, J. G. **Desenvolvimento de formulação cosmética contendo carreadores lipídicos nanoestruturados à base de manteiga de *Ouratea* sp.:** uma estratégia nanotecnológica para o aumento da hidratação cutânea. 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015.

GANGULY, S. & MITCHELL, A. P. **Biofilmes mucosos de *Candida albicans*.** *Curr Opin Microbiol* (2011).

GARDINAZI, T. *et al.* **Phagocytosis and oxide production by peritoneal adherent cells in response to *Candida albicans* in aging: a collaboration to elucidate the pathogenesis of denture stomatitis.** *J Appl Oral Sci*, dec. 2016.

GLURICH, I. *et al.* **The Oral – Systemic Personalized Medicine Model at Marshfield Clinic.** *Oral Dis*, p.1-17, 2014.

GOIATO, M. C. *et al.* **Condições intra e extras orais dos pacientes geriátricos portadores de prótese total.** *PCL, Curitiba*. v.4, n.21, p.380-386, set. / Out., 2005.

GOMES, S. V. F. *et al.* **Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer-Ecletica** *Química*. p.64-77, 2011.

GRAMPUROHIT *et al.* **Microemulsions for Topical Use - A Review.** *Indian Journal of Pharmaceutical Research and Education*, v.45, n.1, p. 100-107, Jan./Mar. 2011.

GUIMARÃES, G. P. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado de tiofeno**. 2013. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

GUIMARÃES, L. G. L. *et al.* **Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estrutura secretoras e atividade antimicrobiana**. Revista CiEnc. Agron. Centro Ciênc. Agrárias, p.267-275, 2014.

GUPTA, S. & MOULIK, S. P. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. J Pharm Sci, p.22-45, Jan.,2008.

HARRIOT, M. M; NOVERR, M. C. ***Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance**. Antimicrob Agents Chemother, p.3914-3922, 2009.

HARWOOD ACADEMIC. **Submicron emulsion in drug targeting and delivery** - CRC Press: Amsterdam, 1998.

HAYES *et al.* **Physicochemical characterization of water – in oil microemulsions formed by a binary 1,3-dioxolane alkyl ethoxylate/Aerosol – OT surfactant system**. Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects, v.417, p.99-110, 2013.

HEBLIN, E. *et al.* **Geriatric dentistry: a new specialty in Brazil**. Gerodontal, p.177 - 80, 2007.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. **Transparent Water-in-Oil Dispersions: The Oleopathic Hydro-Micelle**. Nature, pa.102-103,1943.

HUBER, M. e TERÉZHALMY, G. (2011). Oropharyngeal candidiasis: etiology, epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Crest Oral-B*. [em linha]. Disponível em <<http://www.dentalcare.com>>. [Consultado em 18/03/2016].

INCZEDY, J. *et al.* **Compendium of Analytical Nomenclature**. Definitive Rules 1997, “The Orange Book”, 3ed. Blackwell Science: Oxford, 1998.

JAVED, F. R. *et al.* **Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence**. Photochem Photobiol Sciences, 13, p.726-734, 2014.

JEGANATHAN, S. & LIN, C. C. **Denture stomatitis – a review of the etiology, diagnosis and management**. Aust Dent J. V.37, n.2. p. 107-114, 1992.

JEGANATHAN, S. *et al.* **Denture stomatitis in elderly edentulous Asian population**. J Oral Rehabil, p.468-72, 1977.

JENKINSON, H. F. **Minireview Beyond the oral microbiome**. Environmental, p. 3077-87, 2011.

JUIZ, P. I. **Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal.** Revista Brasileira de Farmacologia. v.20. n.1, p. 134-139, 2010.

KANDELMAN, *et al.* **Oral health general health, and quality of life in older people.** Spec Care Dentist, p.224-36, 2008.

KAZUO, S. D. *et al.* **Higienização em prótese parcial removível.** Rev de Odont da Univ Cid de São Paulo, p.168-174, 2008.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados Estabilizados com Álcool Cetílico Etoxilado e Propoxilado Contendo Fluconazol Potencialmente Ativo Contra Esporotricose. 2007.114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.**

KLEINNEGGER, C. *et al.* **A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis.** Oral Survy Pathol Oral Radiol Endod, p.62-7, 2001.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. **Candida infections of medical devices.** Clin Microbial Rev., p.255-267, 2004.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido.** 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KONG, M & PARK, H. J. **Sensibility investigation of hyaluronic acid based microemulsions its potential as transdermal carrier.** Carbohydrat e Polymers. v. 83, p.1303-1310, 2011.

KOO, H. R. P. L. *et al.* **Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *Streptococcus*.** Curr Microbial, p.192-6, 2000.

KORDALI, S. *et al.* **Antifungal, phytotoxic, and insecticidal propenties of essential oil isolated from Turkish organum and its these components, carvracrol, thymol and  $\rho$ -cymene.** Bioresource Technology, December, 2008.

KUMAR, G. *et al.* **Tendências emergentes de fitoterápicos em odontologia.** J Clin Dingn Res., p.1827-1829, 2013.

LDEP - Laoratório de Demografia e Estudos Populacionais - 21/07/2020.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* **Análise do timol por CLAE em tinturas de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.13, p.9-11, 2003.

LEE, S. Y. **Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivales* hemin binding and coagregation with oral streptococcus.** J oral Science. v.43, n.17, p.1-7, 2001. Mutans. In: CIFARP, 2005,

Ribeirão Preto. Brazilian Journal of pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto: USP, 2005. v.41, p.367-367.

LEMOS, T. L. G. *et al.* **Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants.** Phytotherapy Research, p. 82-84, 1990/1992.

LEWIS, K. I. M. **Enigma da resistência do biofilme.** Antimicrob Agents Chemother (2011) 45:999-1007, p.999-1007, 2001.

LI, X. *et al.* **Study on conductivity property and microstructure of TritonX-100/alkanol/n-heptane/water microemulsion.** Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. v. 360, p.150-153, 2012.

LINDE, G. A. *et al.* **Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*.** Ver. Bras. p1. Med, Campinas, v.18, n.1, p. 191-200, 2016.

LOESCHE, W. J. **Ecology of *Streptococcus mutans* in the human mouth and evidence for its role in caries initiation.** In: Symposium on current Topics in Dental Caries, Matsuto, Japan. Proceedings. p. 180-97, 1982.

LOMBARD & BUDTZ-JORGENSEN, E. **Treatment of denture-induced stomatitis: a review.** Eur J Prosthodont Dent. p.17-22, Set. 1993.

LU, Y. *et al.* **Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary Chromatography.** Fitoterapia. p. 267-76, Jun. 2004.

MARCHINI, L. *et al.* **Self-reported oral hygiene habits among institutionalized elderly and their relationship to the conditions of oral tissues in Taubate, Brazil.** Gerodontology. p. 33-7, 2001.

MARQUES, S. A. & CAMARGO, R. M. P. **Paracoccidioidomycose.** In: Zaitz *et al.* Compêndio de micologia médica. Rio de Janeiro: Medsi. p.231-263, 1998.

MARK, H. E. *et al.* **A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae.** **American Journal of Botany**, v.97, n.10, p.1647-1663, 2010.

MARTINS, M. L. *et al.* **Uso de Fitoterápicos Associados a Próteses Dentárias.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v. 18, n.3, p. 271-278, 2014.

MAYER, F. L. *et al.* ***Candida albicans* pathogenicity mechanisms.** Virulence. p.119-128, 2013.

NEMEZES *et al.* **Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no estado do Ceará.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v.2, n.3, p.354-355, 2009.

MOGHIMIPOUR, E. *et al.* **Design and Characterization of Microemulsion Systems for Naproxen.** *Advanced Pharmaceutical bulletin*, Tabriz. v.3, n.1, p. 63-71, 2013.

MONTEIRO, M. V. B. *et al.* **Topical anti-inflammatory gastoprotective and antioxidante effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves.** *Journal of Ethnopharmacology*. v.111, n.2 p.378-382, 2007.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO. **Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos.** Fortaleza: EDUECE, 2007.

MULLER, F. **Higiene Oral em pacientes Geriátricos. O paciente doente.** In: **Dwismeijer, S Chen, D Buser, editors. Terapia de implantes em pacientes geriátricos. Guia de tratamento ITI.** Berlim: Quintessência, p.145-155, 2016.

MURRAY, P. R. **Microbiologia médica.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NEMICHAND, S. K. & LAXMAN, S. D. **Solubility Enhancement of Nebivolol by Micro Emulsion Technique.** *J Young Pharm.* v. 8, n. 4, p. 356-367, 2016.

O'DONNELL, L. E. *et al.* **The Oral Microbiome of Denture Wearers is Influenced by Levels of Natural Dentition.** *PLoS One*. p.1-22, 2015.

O'DONNELL, L. E. *et al.* **Denture are a reservoir for respiratory pathogens.** *J Prosthodont.* p. 99-104, 2016.

OKUR, N. U. *et al.* **Preparation and evaluation of novel microemulsion-based hydrogels for dermal delivery of benzocaine.** *Pharm Rev Technol.* p. 1-11, 2016.

OLIVEIRA, M. L. M. *et al.* **Tropical continuous use of *Lippia sidoides* Cham. essential oil induces cutaneous inflammatory response but does not delay wound healing process.** *J. Ethn.* p.283-289, 2014.

OLIVEIRA, Â. Z. M. **Desenvolvimento de Formulação Cosméticas com Ácido Hialurônico.** Faculdade de Farmácia: Universidade do Porto, 2009.

OLIVEIRA *et al.* **Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K.** *Food Chemistry*, v.101, p.236-240, 2007.

OLIVEIRA, C. T. **Influência das épocas seca e chuvosa no comportamento de acesso alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) mantida em Banco Ativo de Germoplasma em São Cristóvão – SE.** 2008. 88p. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2008.

OLIVEIRA, D. R. *et al.* **Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H. B. K.** *Food Chemistry*. 101:236-240, 2007.

OLIVEIRA, M. J. R. et al. **Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no estado de São Paulo, Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.8, n.2, p. 39-41, 2006.

OLIVEIRA, A. G. et al. **Micro e nanocapsulas: um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara. v.14, p.37-49, 1992.

O'TOOLE, G. et al. **Formação de biofilme como desenvolvimento microbiano**. Annual Rev Microbiol (2000), p.49-79, 2000

PATIL, M. S. & PATIL, S. B. **Geriatric patient – psychological and emotional considerations during dental treatment**. Gerodontol. p.72-74, 2009.

PAIVA, et al. **Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de gato) sobre candidiose oral**. Revista Brasileira de Farmacognosia, p.428-8, 2008.

PARANHOS et al. **Capacity of denture plaque/biofilm removal and antimicrobial action of a new denture past**. Braz Dent J. p.97-104. 2000.

PASCUAL, M. N. et al. **Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbenaceae)**. Fármaco, v. 26, p, 501-504, 2001b.

PATEL, H. K. et al. **Tropical delivery of clobetasol proppionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: Ex vivo permeation and skin irritation studies**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.102, p. 86-94, 2013.

PELTOLA, P et al. **Oral health and tretment needs of the long – trem hospitalized elderly**. Gerodontol. p.93-9, 2004.

PERAZZO, P. S. L. et al. **Candidíase Laríngea Isolada em pacientes imunocompetentes: Relato de caso e Revisão de Literatura Pertinente**. Rev. Bras Otorrinolaringol, v.70, n.2, p.278-282, 2004.

PERACINI, A. et al. **Behaviors and hygiene habits of complete denture wearers**. Braz Dent J. p.247-52, 2010a.

PEREIRA-CENCI, T. **Avaliação da formação de biofilme de espécies de *Candida* sobre a superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses removíveis**. 2008. 101F. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica - área de Prótese Dentária) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2008.

PEREIRA, J. B. **Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana**. Pesq Bras Odont Clínica Int, v.4, p. 264, 2004.

PEREIRA, J. V. *et al.* **Estudo com o extrato da *Punica granatum* Linn. (Romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentífrico sobre microrganismos do biofilme dental.** Rev. Odonto Cienc, p. 262-9, 2005.

PEREIRA, A. C. *et al.* **Oral health and periodontal status in Brazilian elderly.** In: RODRIGUES, S. N.; VARGAS, A. M. D.; MOREIRA, A. N. Saúde bucal e qualidade de vida no idoso. Revista Científica da Faculdade de Ciências da Saúde (FACS) da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), v. 1, n.12, 2004.

PEREIRA, J. V. *et al.* **Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato de *Punica granatum* linn. sobre microrganismos do biofilme dental.** Rev Bras Farmacogn. P.88-93, 2006.

PEREIRA, C. A. *et al.* **Susctibility of *Candida albicans*, streptococcus mutans and streptococcus mutans biofilms to photodynamic: an in vitro study.** Lasers Med Sci. p.341-8, 2011a.

PEREIRA *et al.* **Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* e *Salmonella* entérica Enteritidis por óleos essenciais.** Ciência Rural, Santa Maria, v.44, n.11, p.2022-2028, 2014.

PETERS, B. M. *et al.* **Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease.** Clin Microbial Rev. p.193-213, 2012.

PETERS, B. M. **Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms.** Antimicrob Agents Chemother.p.74-82, 2013.

PETERS, B. M. *et al.* **Microbial interactions and differencial protein expression in *Staphylococcus aureus* - *candida albicans* dual species biofilms.** FEMS Immunology & Medical Microbiology. p.493-503, 2010.

PETERSEN, P. E. & YAMAMOTO, T. **Improving the orl healt of older people: the approach of the Who Global Health Programme.** Communit Dent Oral Epidemial. P.81 – 92, 2005.

PETROVSKA, B. B. **Revisão histórica do uso de plantas medicinais.** Pharmacogn, 2012. Ver. 6:1-5 [Crossref], [PubMed], Google Acadêmico] of Thymus oils and their major componds. Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology. 2004, v. 18, p. 73-78.

PHOENIX, R. **Clinical removable partial prosthodontics.** 3.ed., Hanover Park: Quintessence Publishing, 2003.

PRUDENTE, R. C. C. & MOURA, R. B. **Evidências científicas para a indicação popular de algumas espécies da família Rutaceae no tratamento de doenças respiratórias na região Sudeste do Brasil.** Infarma, Ciências Farmacêuticas, v.25, n.1, 8p, 2013.

PYLE, M. A. & STOLLER, E.P. **Oral health disparities among the elderly: interdisciplinary challenges for the future.** J Dent Educ. p.1327-36, 2003.

PUCCA JR., G. A. **Saúde bucal do idoso. Aspectos sociais e preventivos.** In: Gerontologia (M. Papaléo Neto, org.). São Paulo: ed. Atheneu, p. 297-310, 1996.

QUEIROZ *et al.* **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus sp.* isolados de alimentos de origem animal.** Revta Bras. Plantas medic. P.737-743, 2014.

QUIRYNEN, M & BOLLEN, C M. **The influence roughness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man.** A review of the literature. J Clin Periodontal. p.1-14, Jan,1995.

RAJGOPAL, A. *et al.* **Immunomodulatory Effects of *Lippia sidoides* Extract: Induction of IL-10nThrough cAMP and p.38 MAPK - Dependent Mechanisms.** Journal of Medicinal Food, v.18, p. 370-377, 2015.

REDFORD *et al.* **Denture Plaque Adherence of *Candida albicans* to Denture-Base Materials *in vivo* and *in vitro*.** *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, Boca Raton, v.10, n.1, p. 99-116, 1999.

REIS, M. Y. de F. A. **“Desenvolvimento e caracterização de microemulsão com óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) para uso tópico”, CCBS, Campina Grande - PB, Brasil, 2014.**

REIS, F. D. *et al.* **Use of *Camobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems.** Int. J. Food Microbial. p. 228-234, 2011.

REZENDE, T. O. **Cuidados bucais em pacientes idosos hospitalizados realizados pelas equipes de enfermagem,** ABENO, 2005 - Monografia de Especialização em Odontogeriatrica, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Salvador, 81p, 2005.

RIBEIRO, A. F. *et al.* **Avaliação antifúngica do óleo essencial de *Lippia organoides* Kunth com ocorrência na Floresta Nacional de Carajás frente ao fitopatógeno *Fusarium sp.*** In: Congresso de Química, 53p, Rio de Janeiro, 2013.

RIVERA, *et al.* **Oral mucosal lesions in a Chilean elderly population: A retrospective study with a systematic review from thirteen countries** J Clin Exp Dent, v.9, n.2, p.276-283, nov. 2017.

ROCHA, E. P. *et al.* **Longitudinal study of the influence of removable partial denture and chemical control on the levels of *Streptococcus mutans* in saliva.** J. Oral rehabil, Oxford, v.30, n.2, p. 131- 8, 2003.

ROCHA *et al.* **Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sesséis em superfície utilizada para corte de alimento.** Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v.13, n.4, p. 338-44, 2014.

RODRIGUES. M. R. *et al.* **Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie.** Cienc Odontol Bras. p. 40-46, 2008.

ROSSI, C. G. F. T. *et al.* **Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial.** Revista de Ciências Exatas da Terra, Seropédica/RJ, v. 26, n. 1-2, p. 45-66, 2009.

SALIMENA, F. R. G. *et al.* **Verbenaceae in lista de espécies da flora do Brasil.** Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/floradobrasil/FB246>. Acesso em 11/maio, 2022.

SALLI, K. M. & OUWEHAND, A. C. **The use of *in vitro* model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review.** E J. Oral Microbial. 26149, Mar, 2015.

SARDI, J. C. O. *et al.* **Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new theratogenic options.** J Med Microbial, p.10-24, 2013.

SANET *et al.* **The effect of bee propolis on recurrent aphtous stomatitis: a polot study.** Clin Oral Investig. p. 143-7, Jun, 2007.

SANTOS, C. L. C. M. **Aplicação de técnicas de DLMME e eg-em na identificação dos constituintes químicos do extrato metanólico dos galhos de *Lippia orignoides* H. B. K.** Trabalho de Conclusão de Curso. UESB, 2015.

SAUNDERS, Jr. R. H. & MEYCROWITZ, C. **Dental caries in older adults Dent Clin North Am.** p.293-308, 2005.

SAWHNEY, R. & BERRY, V. **Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostic and control: An overview.** Indian j. med. Sci.,p.313-321, 2009.

SCHAFFAZICK *et al.* **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química Nova. v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SENEVIRATNE, C. J. & SAMARANAYAKE, L. P. **Biofilm lifestyle of Candida: a mini review.** Oral Diseases; p.582-590, 2008.

SCHULMAN, J. H. *et al.* **Phys.** Chem. 1959, 63, 1677.

SESMA *et al.* **Eficiência de métodos caseiros de higienização e limpeza de próteses parciais removíveis.** Rev. APCD. p.463-467, 1999.

- SESMA, N. *et al.* **Capacidade de remoção do biofilme por meio de um produto enzimático para higienização de bases protéticas.** RPG Rev Pós Grad, p.417-422, 2005.
- SHAH, P. *et al.* **Nanoemulsion: A Pharmaceutical review - Systematic Review in Pharmacy,** v.01, p. 24-32, 2010.
- SHAY, K. **Denture hygiene: a review and update.** J Contemp Dent Pract. p.28-41, Feb 15, 2000.
- SIENKIEWICZ, M. **Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils.** Int Rev Allergol Clin Inimunol, v.17, p. 40-44, 2011.
- SILVA, R.; SEIXAS, Z. A. **Materiais e métodos de higienização para próteses removíveis.** International Journal of Dentistry. v. 7, n.2, p.125-132, 2008.
- SILVA, V. A. *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiano do extrato da Lippia sidoides cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus mutans*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, vol.12, n.4, p.452-455, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso e, 05/08/2022.
- SILVA, A. R. B. da. **Biofilmes e lentes de contato.** 2012. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando pessoa, Porto. 2012.
- SILVA, C. H. & PARANHOS, H. F. Efficacy of biofilm disclosing agent and of three brushes in the control of complete denture cleansing. **J Appl Oral Sci.** Dec; 14(6):454-9, 2006.
- SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** 3.ed. São Paulo: Livraria Varela, 552p. 2007.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, 2004.
- SINHA, A. & SINHA. **Medicamentos naturais em endodontia,** 35: 13-118, 2014.
- SIINKO, P. J. Martin: **Físico – Farmácia e Ciências Farmacêuticas.** 5.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008.
- SIROCCHI, V. *et al.* Effect of Rosmarinus officinalis L. essential oil combined with different packaging conditions to extend the shel life of refrigerated beef meat. **Food Chemistry** v. 221, 15 April, p. 1069-1076, 2017.
- SMITH, N. *et al.* Florewing plantd of the neotropics. (Eds). Princeton University Press in Association with Ney York Botanical Garden Princeton, New Yersey. 594p, 2004.
- SOARES, A. P. **Aplicação de Microemulsão na Recuperação de Petróleo de Reservatórios Carbonáticos,** 2012. 112f. Dissertação [Mestrado em Engenharia Química] – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federalm do Rio Grande do Norte, Natal.

SOROVIC, M. *et al.*, Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, v.15, n.11, p. 7532-7546, 2010.

SOYAMA, P. **Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas**: *Ciencia Cult.* 59(1)12-3, 2007.

SOUZA, C. P.; TAMAKI, R. **Implicações do uso de prótese total na geriatria**. *Robrac, Goiânia*, v.6, n.19, p.29-31, 1996.

STASHENKO, E. E. *et al.* *Lippia origanoides* Chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of separation science**, v.33, n.1, p. 93-103, 2010.

SUBEDI *et al.* Recent advances in transdermal drug delivery. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 33, n.3, p.339-351, 2010.

SZYSZKOWSKA, A. *et al.* **O uso de plantas medicinais no tratamento odontológico**. *Estrutura*. 56:97-107, 2010.

TASSO, C. O. Efetividade Clínica de Sabonetes Líquidos desinfetantes no controle do biofilme presente em próteses dentais removíveis. [dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista]. Repositório Institucional UNESP, 2019.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. Ed.3. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

TELES, R. M. Estudo analítico do linolol contido no óleo essencial extraído de galhos da espécie *Aniba duckei* Kostermans e sua aplicação como agente bactericida. São Luis Programa de Pós-Graduação em Química, UFMA, 2003. Dissertação de Mestrado, 99p.

THAERI, J. *et al.* Herbs in dentistry. **Int Dent J.**,6, 287-296, 2011.

TEIXEIRA, L. V. Análise Sensorial na Indústria de Alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tortes”**, São Paulo, V.64, n.366, 2009.

THORTON-EVANS, G. *et al.* Periodontite em adultos com idade de 30 anos nos Estados Unidos. *Morb. Mortal WKLY*, 62(03): 129-135. 2013.

TOZZO, A. B. GRAZZIOTIN, N. A. **Candidíase vulvovaginal**. **Perspectiva**.36(133):53-62, 2012.

URIZAR, J. M. A. Candidiasis orales. **Rev Iberoam Micol.** 19:17-21, 2002.

VASCONCELOS *et al.* Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pome granale) gel against *S. mutans*, *S. miris* and *C. albicans*. **Braz Oent J.** (17(3): 223-7, 2006.

VEGA-VELA, N. E. & MICHACÓN-SANCHEZ. Estrutura genética ao longo de um gradiente altitudinal em *Lippia origanoides*, uma espécie de planta aromática

promissora restrita a áreas semiáridas da América do Sul. **Eco Evoluir**. 2(11), p.2669-2618, 2012.

VEJA-VELA, et al. Genetic Structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. *Agron. Colomb*, v.31, n.1. p.5-17, 2013.

VERMA, P. K. & GASCO, S. Current Status of drug delivery technologies and future directions. **Pharm Technol**. 2001; 25(2): 1-14.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos De resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Rev Bras Anal Clin**. 49(3): 235-239, 2017.

ZAGO, T. E. **Fatores de virulência e infecção epitelial in vitro de biofilme simples e mistos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* sensível (MSSA) e resistente à meticilina (MRSA)**: Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, Faculdade de Odoontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, 2015.

ZARCO, M. F. *et al*. The oral microbione in healt and disease and the potential impact on personalized dental medicine. **Oral Diseases**. 18(2): p. 109-120, 2012.

WADE, W. G. **The oral microbiome in health and disease**. *Pharmacol Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;1-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>

WANG L, GANLY I. **The oral microbiome and oral cancer**. *Clin Lab Med* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;34(4):711-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2014.08.004>

WEBB, B. C. *et al*. A 2 - years study of *Candida* - associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. **Gerodontology**. 22(3):168-76, Sep, 2005.